

3

2009



Vedecký časopis pre potravinárstvo

číslo

[www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com)

ročník 3  
číslo 3  
september 2009

potravinárstvo 3 (3)  
ISSN 1338-0230 (tlačaná verzia)  
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)

## Potravinárstvo

### Vedecký časopis pre potravinárstvo

**Šéfredaktor:**

Ing. Peter Zajác, PhD.  
SPU Nitra

**Zástupca šéf redaktora:**

doc. Ing. Jozef Golian, Dr.,  
SPU Nitra

**Redaktori:**

Ing. Radoslav Židek, PhD.,  
Ing. Jozef Čapla,  
SPU Nitra

**Predseda redakčnej rady:**

doc. Ing. Jozef Golian, Dr.,  
SPU Nitra

**Redakčná rada**

doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, PhD.,  
VFU Brno  
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.,  
UTB Zlín  
prof. MVDr. Jozef Nagy, PhD.,  
UVL Košice  
doc. Ing. Jolana Karovičová, CSc.,  
STU Bratislava  
doc. Ing. Róbert Toman, Dr.,  
SPU Nitra  
prof. Dr. Teresa Fortuna, DSc.,  
UA Krakow, Poľsko  
prof. Tadeusz Trziszka, Ph.D., DSc.,  
Wroclav, Poľsko  
Ing. Roman Labuda, PhD.,  
Tuln, Rakúsko  
Ing. Zuzana Bírošová, CSc.,  
Ministerstvo pôdohospodárstva SR

## Potravinárstvo

### Scientific journal of food science

**Editor:**

Peter Zajác  
SUA Nitra

**Deputy of Editor:**

Jozef Golian  
SUA Nitra

**Sub-Editor:**

Radoslav Židek,  
Jozef Čapla,  
SUA Nitra

**Chairman, Editorial Board:**

Jozef Golian,  
SUA Nitra

**Editorial Board:**

Bohuslava Tremlová,  
UVPS Brno, Czech Republic  
Stanislav Kráčmar,  
TBU Zlín, Czech Republic  
Jozef Nagy,  
UVM Košice, Slovakia  
Jolana Karovičová,  
SUT Bratislava, Slovakia  
Róbert Toman,  
SUA Nitra, Slovakia  
Teresa Fortuna,  
UA Krakow, Poland  
Tadeusz Trziszka,  
Wroclav, Poland  
Roman Labuda,  
Tuln, Austria  
Zuzana Bírošová,  
Ministry of Agriculture SR

• **Potravinárstvo**® • **Ročník:** 3, č. 3/2009 • **Vedecký časopis pre potravinárstvo** • **Scientific journal of food science** • **Vydavateľ:** Ing. Peter Zajác, HACCP Consulting. Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce. Vydavateľ úzko spolupracuje s Katedrou hygieny a bezpečnosti potravín, FBP, SPU v Nitre • **Nakladateľ:** Združenie HACCP Consulting. Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **Periodicita:** vychádza 4x do roka • **Internetová stránka časopisu:** [www.potravinarstvo.com](http://www.potravinarstvo.com) • **Adresa redakcie:** Slivková 12, 951 01 Nitrianske Hrnčiarovce • **E-mail:** [info@potravinarstvo.com](mailto:info@potravinarstvo.com) • **Tel.:** +421908164361, +421904138562 • **Jazyková úprava:** Publikované články neprešli jazykovou úpravou • **Grafická úprava:** Flame-studio Nitra • **Tlač:** SPU Nitra • **Cena čísla:** nepredajné • **Distribuuje:** Združenie HACCP Consulting • **Náklad:** 150 ks • **Miesto vydania:** Nitra • **Právne informácie a autorské práva:** Za obsah jednotlivých článkov zodpovedajú autori. Za obsah inzerátov zodpovedajú inzerenti.

Všetky práva vyhradené, © 2009 Potravinárstvo®  
Evidenčné číslo Ministerstva kultúry SR: 3771/09  
ISSN 1338-0230 (tlačaná verzia)  
ISSN 1337-0960 (elektronická verzia)



Katedra hygieny a bezpečnosti  
potravín

H A C C P  
CONSULTING

## ÚROVEŇ KONTAMINÁCIE SVALOVINY RÝB ŤAŽKÝMI KOVMÍ NA HORNEJ NITRE

### CONTAMINATION RATE OF FISH MUSCLE BY HEAVY METALS FROM THE UPPER NITRA RIVER

Jaroslav Andreji, Ivan Stráňai, Pavel Nad', Magdaléna Skalická

#### ABSTRACT

This study presents a rate of heavy metals accumulation in the muscle of five common cyprinid fish species – barbel (*Barbus barbus*), gudgeon (*Gobio gobio*), European chub (*Leuciscus cephalus*), roach (*Rutilus rutilus*), and nase (*Chondrostoma nasus*) from the upper Nitra River near the Opatovce nad Nitrou village. The samples were collected in September 2005, analyzed by AAS and evaluated in mg.kg<sup>-1</sup> of fresh matter. Concentrations of heavy metals in the muscle were as follows: Cu 15.39–25.97, Ni 0.00–3.72, Pb 0.00–1.81, and Cd 0.00–0.11. Statistically significant differences in relationship between heavy metals concentration and standard length (SL) and weight (w) were confirmed only in Cu and Cd. Exceeding limit of contaminants was recorded for Cu (100%), Ni (12%), Pb (6%) and Cd (10 %). In average, the order of metal concentrations in the fish muscle was: Cu > Ni > Pb > Cd.

**Keywords:** heavy metal, accumulation, fish, Nitra River

#### ÚVOD

Rieka Nitra je známa svojou ekologickou záťažou v podobe dnových sedimentov. Táto skutočnosť je známa už vyše polstoročia a jej efekt je natoľko silný, že ešte aj dnes sa stretávame s prítomnosťou jednotlivých kontaminantov v rôznych zložkách potravinového reťazca. V tejto práci podávame prehľad vybraných kontaminantov zo skupiny ťažkých kovov kumulovaných v rybách, ako teoreticky najvyššej zložke potravinového reťazca vo vodnom prostredí, tento krát z horného Ponitria.

#### MATERIÁL METODIKA

Ryby (50 ks) boli odlovené elektrickým agregátom v septembri 2005 z rieky Nitra v Opatovciach nad Nitrou, ktorá je rybárskym revírom Nitra č. 6 v správe MsO SRZ Prievidza. U týchto rýb sa urobilo základné biometrické vyšetrenie a determinácia. Následne sa z každého kusa odobrala vzorka svaloviny v množstve 3 až 5 g na stanovenie obsahu cudzorodých látok (Cu, Ni, Pb, a Cd), ktoré boli do samotnej analýzy uskladnené pri –18 °C.

Samotné stanovenie obsahu jednotlivých ťažkých kovov bolo vykonané metódou AAS (atómová absorpčná spektrofotometria) za použitia roztoku HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O (2:1) na prístroji Pye Unicam SP9 a hodnoty sú vyjadrené v mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty (Massányi et al. 2003; Gašparík et al. 2004). Zistené výsledky sa štatisticky vyhodnotili metódou regresnej analýzy a analýzy variance na signifikantnej úrovni 95 %, 99 % a 99,9 % v programe Statgraphics Centurio XV (v. 15.1.02) a porovnali sa s Potravinovým kódexom SR upravujúcim hodnoty cudzorodých látok v potravinách.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzovaných bolo celkovo 50 kusov kaprovitých rýb patriacich k piatim druhom: mrena severná (*Barbus barbus*), hrúz škvorný (*Gobio gobio*), jalec hlavatý (*Leuciscus cephalus*), plotica červenooká (*Rutilus rutilus*), a podustva severná (*Chondrostoma nasus*). Ich bližšia biologická charakteristika je uvedená v tabuľke 1. Namerané hodnoty koncentrácií jednotlivých ťažkých kovov vo svalovine sú uvedené v tabuľkách 2 – 3 a závislosti medzi koncentráciou jednotlivých ťažkých kovov a dĺžkou

**Tabuľka 1** Biologická charakteristika analyzovaných druhov rýb

Druh	N	dĺžka tela (mm)		hmotnosť (g)	
		priemer ± s	rozpätie	priemer ± s	rozpätie
hrúz škvorný	10	114 ± 12,83	103 - 147	25 ± 10,11	18 - 53
jalec hlavatý	10	223 ± 22,87	190 - 272	207 ± 74,77	133 - 393
mrena severná	10	246 ± 40,05	182 - 300	222 ± 96,18	80 - 359
plotica červenooká	10	128 ± 23,48	100 - 175	53 ± 33,16	20 - 132
podustva severná	10	270 ± 32,97	210 - 320	317 ± 99,28	151 - 502

**Tabuľka 2** Namerané koncentrácie medi a niklu (mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty)

Druh	Cu		Ni	
	priemer ± s	rozpätie	priemer ± s	rozpätie
hrúz škvorný	23.54 ± 0.97	22.26 - 24.92	0.15 ± 0.18	0.00 - 0.55
jalec hlavatý	17.25 ± 1.50	15.39 - 19.51	0.75 ± 1.36	0.00 - 3.39
mrena severná	22.10 ± 1.94	19.22 - 25.97	0.20 ± 0.42	0.00 - 1.37
plotica červenooká	24.00 ± 0.77	22.95 - 25.21	0.37 ± 1,18	0.00 - 3.72
podustva severná	21.95 ± 0.84	20.74 - 23.60	0.07 ± 0.11	0.00 - 0.34
<b>Celkom</b>	<b>21.77 ± 2.69</b>	<b>15.39 - 25.97</b>	<b>0.31 ± 0.82</b>	<b>0.00 - 3.72</b>

**Tabuľka 3** Namerané koncentrácie olova a kadmia (mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty)

Druh	Pb		Cd	
	priemer ± s	rozpätie	priemer ± s	rozpätie
hrúz škvorný	0.10 ± 0.08	0.00 - 0.21	0.05 ± 0.03	0.02 - 0.11
jalec hlavatý	0.04 ± 0.05	0.00 - 0.16	0.01 ± 0.01	0.00 - 0.03
mrena severná	0.04 ± 0.04	0.00 - 0.12	0.01 ± 0.02	0.00 - 0.06
plotica červenooká	0.06 ± 0.05	0.00 - 0.16	0.01 ± 0.01	0.00 - 0.03
podustva severná	0.23 ± 0.56	0.00 - 1.81	0.01 ± 0.01	0.00 - 0.01
<b>Celkom</b>	<b>0.09 ± 0.25</b>	<b>0.00 ± 1.81</b>	<b>0.02 ± 0.02</b>	<b>0.00 - 0.11</b>

**Tabuľka 4** Korelačné koeficienty jednotlivých ťažkých kovov vo vzťahu k dĺžke tela (Sl) a hmotnosti (w)

	Cu	Ni	Pb	Cd
Sl	-0,423**	-0,026	0,150	-0,393**
w	-0,384**	-0,045	0,172	-0,374**

\*\* P<0,01

tela, resp. hmotnosťou sú vyjadrené korelačnými koeficientmi v tabuľke 4.

Spomedzi všetkých analyzovaných prvkov v svalovine rýb sa med' nachádzala v najvyšších koncentráciách. Zaznamenané hodnoty sa pohybovali v rozpätí 15,39 – 25,97 mg.kg<sup>-1</sup>, s priemernou hodnotou 21,77 mg.kg<sup>-1</sup>. Najnižšia priemerná hodnota 17,25 mg.kg<sup>-1</sup> bola zaznamenaná u jalca hlavatého, najvyššia (24,00 mg.kg<sup>-1</sup>) bola zaevidovaná u plotice červenookej. V rámci jednotlivých druhov sme zaznamenali štatisticky vysoko významné rozdiely v akumulácii medi vo svalovine (P<0,001). Podobne sme zaevidovali aj štatisticky významnú (P<0,01) negatívnu koreláciu v závislosti k dĺžke tela i hmotnosti. Najvyššie prípustné množstvo (NPM) definované v Potravinovom kódexe (10,0 mg.kg<sup>-1</sup>) bolo v tomto prípade prekročené u všetkých analyzovaných vzoriek (100 %) 1,5 – 2,6 násobne. Je to dosť nezvyčajný jav, pretože med' sa v svalovine rýb z voľných vôd alebo farmovo chovaných bežne vyskytuje v hodnotách do 1,0 mg.kg<sup>-1</sup> a zriedka kedy prekračuje hodnotu 5,0 mg.kg<sup>-1</sup> (Andreji a Stráňai, 2001; Žlábek et al., 2006; Andreji et al., 2007).

Zaevidované hodnoty niklu akumulovaného v svalovine piatich druhov rýb sa pohybovali v rozmedzí 0,00 – 3,72 mg.kg<sup>-1</sup>, s priemernou hodnotou 0,31 mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty. Najnižšia priemerná koncentrácia niklu bola zistená u podustvy severnej (0,07 mg.kg<sup>-1</sup>), naopak najvyššia u jalca hlavatého (0,75 mg.kg<sup>-1</sup>), štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými druhmi však zistené neboli (P>0,05). Taktiež sa nepotvrdila štatistická významnosť závislosti dĺžky tela a hmotnosti na koncentrácii niklu v svalovine (P>0,05). Prekročenie NPM 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> bolo zistené u 6 vzoriek (12 %) a prekročenie predstavovalo 2,7 – 18,6 násobok. Namerané priemerné hladiny niklu vo svalovine jednotlivých druhov rýb sú štandardné a aj na iných lokalitách, či už tečúcich alebo stojatých sa bežne vyskytujú do 0,3 mg.kg<sup>-1</sup> (Andreji et al., 2005, 2006a, Stráňai a Andreji, 2002). Hodnoty nad 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> sa vyskytujú menej často a najpravdepodobnejšie súvisia s geologickým podložím, resp. spôsobom výživy (Hasschön, 2006).

Olovo sa v svalovine analyzovaných rýb kumulovalo v rozmedzí 0,00 – 1,81 mg.kg<sup>-1</sup>, s priemernou hodnotou 0,09 mg.kg<sup>-1</sup>. V priemere najnižšia koncentrácia (0,04 mg.kg<sup>-1</sup>) bola zistená u jalca hlavatého a mreny severnej, najvyššia koncentrácia 0,23 mg.kg<sup>-1</sup> bola zaznamenaná u podustvy severnej. Medzidruhové rozdiely v akumulácii olova vo svalovine zistené neboli (P>0,05). Pri zisťovaní závislosti miery akumulácie vo vzťahu k dĺžke tela a hmotnosti sa zistila pozitívna korelácia, ale bez štatisticky významnej miery preukaznosti (P>0,05). NPM 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> bolo zaznamenané u 3 vzoriek (6 %) a hodnota prekročenia dosiahla 1,01 – 9,1 násobok. Nami prezentované hodnoty miery akumulácie olova v svalovine rýb sú doposiaľ najnižšie v porovnaní s hodnotami

publikovanými zo strednej alebo dolnej časti rieky Nitra (Andreji et al., 2005, 2006b), ale porovnateľné napr. s hodnotami vo Váhu pri Piešťanoch (Andreji a Stráňai, 2002). Vyššie hodnoty sú vo väčšine prípadov u rýb z voľných vôd než u rýb pochádzajúcich z farmového chovu, ktoré sú pod veterinárnym dohľadom.

Najnižšie koncentrácie spomedzi všetkých analyzovaných prvkov boli zaznamenané u kadmia. Namerané koncentrácie sa pohybovali v rozpätí 0,00 – 0,11 mg.kg<sup>-1</sup>, s priemernou hodnotou 0,02 mg.kg<sup>-1</sup>, pričom najvyššia priemerná hodnota (0,05 mg.kg<sup>-1</sup>) bola zistená u hrúza škvrtitého. Analýzou výsledkov sme zistili štatisticky významnú (P<0,01) medzidruhovou rozdielnosť v akumulácii kadmia vo svalovine a taktiež sme zaznamenali štatisticky významnú (P<0,01) negatívnu koreláciu v akumulácii kadmia vo vzťahu k dĺžke tela a hmotnosti. Hodnota NPM 0,05 mg.kg<sup>-1</sup> bola prekročená u 5 vzoriek a miera prekročenia sa pohybovala v rozmedzí 1,12 – 2,26 násobne. Hodnoty kadmia sú podobne ako hodnoty olova doposiaľ najnižšie publikované z rieky Nitry, čo sa aj predpokladalo, nakoľko chemický a banský priemysel ako najväčší potenciálny znečisťovateľ je majoritne dislokovaný v strednej časti rieky Nitra. Aj v tomto prípade môžeme povedať, že hodnoty kadmia v svalovine rýb z voľných vôd vykazujú vyššie hladiny (Erdoğrul a Ateş, 2006) ako u rýb z farmového chovu, ale aj tu sa nájdú výnimky (Foran et al., 2004; Andreji et al., 2007).

## ZÁVER

Ryby sú veľmi zdravá a chutná potravina, ktorá na druhej strane môže so sebou prinášať aj určité skryté riziko vo forme kumulovaných kontaminantov. Toto riziko je vyššie v prípade konzumácie rýb pochádzajúcich z voľných vôd, ktoré nie sú pod veterinárnym dozomom a potvrdzujú to aj naše analýzy, kde sme zistili prekročenie NPM v rámci jednotlivých kovov u 6 – 100 % analyzovaných vzoriek. V priemere však NPM bolo prekročené len u medi. Pre komplexnejšie posúdenie bezpečnosti konzumácie týchto rýb by bolo vhodné mať aj výsledky iných závažných kontaminantov, akými sú napr. arzén, ortuť, metylortuť a pod. Avšak na základe Potravinového kódexu SR potraviny, ktoré majú prekročené NPM čoby len v jednom ukazovateli, sa nesmú používať na priamy konzum. Z tohto dôvodu preto neodporúčame konzumovať ryby ani z tohto úseku rieky Nitra.

## LITERATÚRA

- ANDREJI, J., STRÁŇAI, I. 2001. Svalovina rýb ako možný zdroj kontaminácie človeka ťažkými kovmi. Pp. 6–8. In P. Massányi & R. Toman (ed.). Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie „Rizikové faktory potravinového reťazca“, Nitra 27.september 2001, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, ISBN 80-7137-916-6.
- ANDREJI, J., STRÁŇAI, I. 2002. Akumulácia jednotlivých ťažkých kovov vo vybraných tkanivách rýb. Pp. 7–9. In P. Massányi & R. Toman (ed.). Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie „Rizikové faktory potravinového reťazca“, Nitra 26. september 2002, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, ISBN 80-8069-076-6.
- ANDREJI, J., STRÁŇAI, I., KAČÁNIOVÁ, M., MASSÁNYI, P., VALENT, M. 2006a. Heavy Metals Content and Microbiological Quality of Carp (*Cyprinus carpio*)

Muscle from Two Southwestern Slovak Fish Farms. In *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, roč. 41, 2006, č. 6, s. 1071–1088.

ANDREJI, J., STRÁŇAI, I., KAČÁNIOVÁ, M. 2007. Koncentrácia niektorých ťažkých kovov a mikrobiologická kvalita mäsa pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) z farmového chovu – predbežná štúdia. In *Bulletin VÚRH Vodňany*, roč. 43, 2007, č. (2), s. 3 – 6.

ANDREJI, J., STRÁŇAI, I., MASSÁNYI, P., VALENT, M. 2005. Concentration of Selected Metals in Muscle of Various Fish Species. In *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, roč. 40, 2005, č. 4, s. 899–912.

ANDREJI, J., STRÁŇAI, I., MASSÁNYI, P., VALENT, M. 2006b. Accumulation of Some Metals in Muscle of Five Fish Species from Lower Nitra River. In *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, roč. 41, 2006, č. 11, s. 2607–2622.

ERDOĞRUL, Ö., ATEŞ, D. A. 2006. Determination of cadmium and copper in fish samples from Sir and Menzelet dam lake Kahramanmaraş, Turkey. In *Environmental Monitoring and Assessment*, roč. 117, 2006, s. 281–290.

FORAN, J. A., HITES, R. A., CARPENTER, D. O., HAMILTON, M. C., MATHEWS-AMOS, A., SCHWAGER, S. J. 2004. A survey of metals in tissues of farmed Atlantic and wild Pacific salmon. In *Environmental Toxicology and Chemistry*, roč. 23, 2004, č. 9, s. 2108–2110.

GASPARIK, J., MASSÁNYI, P., SLAMECKA, J., FABIS, M., JURCIK, R. 2004. Concentration of selected metals in liver, kidney and muscle of the red deer (*Cervus elaphus*). In *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, roč. 39, 2004, s. 2105–2111.

HAS-SCHÖN, E., BOGUT, I., STRELEC, I. 2006. Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of river Neretva (Croatia). In *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, roč. 50, 2006, s. 545–551.

MASSÁNYI, P., TATARUCH, F., SLAMECKA, J., TOMAN, R., JURCIK, R. 2003. Accumulation of lead, cadmium and mercury in liver and kidney of the brown hare (*Lepus europaeus*) in relation to season, age and sex in the west Slovakian lowland. In *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, roč. 38, 2003, s. 1299–1309.

STRÁŇAI, I., ANDREJI, J. 2002. Kontaminácia tkanív rýb ľavobrežných vnútrozemských voľných vôd v oblasti vodného diela Kráľová. Pp. 126–129. In P. Massányi & R. Toman (ed.). Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie „Rizikové faktory potravinového reťazca“, Nitra 26. september 2002, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, ISBN 80-8069-076-6.

ŽLÁBEK V., RANDÁK T., SVOBODOVÁ Z., VALENTOVÁ O., ČELECHOVSKÁ O., MÁCHOVÁ J., KOLÁŘOVÁ J., HAJŠLOVÁ J., DUŠEK L. 2006. Hygienická kvalita rýb z rybníků ČR. In *Bulletin VÚRH Vodňany*, roč. 42, 2006, č. 3, s. 97–100.

### Pod'akovanie:

Príspevok vznikol vďaka finančnej podpore GA MŠ SR VEGA 1/0074/08 a 1/0696/08.

### Kontaktná adresa:

Ing. Jaroslav Andreji, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, KHMHZ, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel.: 037 641 47 31, E-mail: Jaroslav.Andreji@uniag.sk

## IMPACT OF IRRIGATION WITH EFFLUENT AND SEWAGE SLUDGE ON HEAVY METAL CONTENT IN CROPS

*A. Behbahaninia, S. A. Mirbagheri, N. Khorasani J. Nouri, A. H. Javid*

### ABSTRACT

There is a gradual decline in availability of fresh water to be used for irrigation in some parts of Iran. Thus, treated wastewater is an available water resource, especially in arid areas. This study designed to investigate the crop uptake of heavy metals from soils under effluent irrigation and sludge application. For this purpose, four plots were made in Shoush, Wastewater Treatment Plant in south of Tehran. Physico-chemical properties of the soil in the plots were determined. Some plants were cultivated in the all plots. After irrigation period heavy metals like Ni, Pb, Fe, Cd, Zn, Cu and Cr was measured in the crops and the surface and layers of soils. The result indicated that usage of sludge increased metal contents in soil and plants and these vegetables can be unsafe for human consumption. The highest mean levels of Ni; Cd was detected in all plants especially in spinach, lettuce and alfalfa. The lowest concentration was found in watermelon and tomato. The comparison of heavy metals uptake among plants showed high positive correlation between watermelon and tomato in all plots. Results showed highly positive and significant  $P < 0.05$  correlation coefficients between Zn and Cd ( $r=0.724^*$ ) in all the plants in different plots.

**Keywords:** sewage sludge, heavy metal, effluent, crops, soil

### INTRODUCTION

The use of sewage sludge as a fertilizer in arable soil is a subject of concern and dispute. As a source of plant nutrient (especially phosphorus and nitrogen) and organic matter, sewage sludge is a beneficial soil amendment, especially for arable soils with low content of organic matter. However, as sewage sludge is a conglomerate of societal wastes, increased concentrations of toxic substances, including trace metals, are generally found in

sludge-amended soils (Bergkvist et al. 2000). With long-term use of sewage waste, heavy metals can accumulate to phytotoxic levels and result in reduced plants growth and/or enhanced metal concentrations in plants, especially in low pH soils, which when consumed by animals then enter the food chain (Chaney, 1994; Kolesarova et al. 2008; Capcarova et al. 2009). Crop species exercise differentially in accumulating metals in their tissue (Datta et al. 2000) and efficiency of different crops in absorption

of metals is judged either by plant metal uptake or by transfer factor of metals from soil to plant (Rattan et al. 2005).

Industrial or municipal wastewater is mostly used for the irrigation of crops, mainly in periurban ecosystem, due to its easy availability, disposal problems and scarcity of fresh water. Irrigation with wastewater is known to contribute significantly to the heavy metal contents of soil. Wastewater contains substantial amounts of toxic heavy metals, which create problems (Chen et al., 2005). Chronic levels intake of toxic metals has adverse impacts on humans and the associated harmful impacts become apparent only after several years of exposure (Ikeda et al. 2000). However, the consumption of heavy metal-contaminated food can seriously deplete some essential nutrients in the body that are further responsible for decreasing immunological defences, intrauterine growth retardation, impaired psycho-social faculties, disabilities associated with malnutrition and high prevalence of upper gastrointestinal cancer rates (Turkdogan et al. 2003).

The large city as Tehran in Iran produces about 2 millions m<sup>3</sup>/day of wastewater, which is treatment, applied in wastewater treatment plants while effluent and sludge from these treatment plants is disposed in agricultural lands. These wastewater irrigated lands have more than one hundred thousands hectares area and are located in south of Tehran, in Varamin plain. Different kinds of vegetables and summer crops are cultivated in these lands. A research on plants in Varamin plains showed chromium and cadmium contents in plants exceed the standard limits, for plants and human consumption (Torabian and Mahjori, 2002). The present study was conducted with an aim to compare the heavy metals (Fe, Ni, Pb, Cd, Zn, Cu, Cr) accumulation potential of some commonly grown vegetables in south of Tehran in Iran. The effect of different kinds of irrigation systems is also studied in these crops to observe the concentrations of accumulated metals to which human beings are exposed.

## MATERIALS AND METHODS

Soil was transferred from the Varamin plain to Wastewater Treatment Plant of Shoush. Four plots (size 2 by 6 m) were made in Shoush Wastewater Treatment Plant in south of Tehran. The plots were filled with these soils. Some physico-chemical properties of the soil were determined in lab.

Watermelon (*Citrulus vulgaris*), tomato (*Lycopersicum*), radish (*Raphanus sativa*), spinach (*Spinacia oleracia*), lettuce (*Lactuca sativa* L.), alfalfa (*Medicago sativa*), basil (*Ocimum* L.) and cress (*Lepidium* L.) were cultivated in each plot. These plants are cultivated in Varamin plain and it is the main reason for their selection. The plots were cultivated in spring 2007. The first plot was irrigated with effluent from Wastewater Treatment Plant, the second one with sludge and pipe water, the third plot with simulated wastewater with heavy metals solution (the concentration of each element in solution was 10 times concentration of heavy metals in drainages of south of Tehran and equal to several years irrigation) and the fourth one with sewage sludge and effluent from Wastewater Treatment Plant. The sludge was incorporated into 0-20 cm plow layer before irrigation in plot 2 and 4.

Fe, Ni, Pb, Cd, Zn, Cu, Cr were determined in effluent and sludge samples of Shosh Plant according to water and wastewater standard method by Varian model 200 atomic absorption.

Drainage channels in south of Tehran were sampled and heavy metals were determined. All of drainages are used for irrigation.

Plant samples were taken from each plot in September 2007. All collected samples of various crops were washed with double distilled water to remove airborne pollutants. The edible parts of the crops samples were weighed and air-dried for a day, to reduce water content. All samples were dried in a hot air oven at 70 °C for 24 hour, to remove all moisture. 1 g of each sample was accurately weighed and placed in crucibles. Then the samples were converted to ash in 450 °C by electrical furnace. The samples were diluted in a HNO<sub>3</sub> and HCl (AOAC, 2000). Fe, Ni, Pb, Cd, Zn, Cu, Cr in the plants extracts were determined by a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (AAS, Varian model 200). For samples with very low heavy metals atomic absorption with inductively coupled plasma (ICP) was used.

## RESULTS AND DISCUSSION

Main physico-chemical properties of the soil samples were measured. According to the results, texture of soil was loamy. pH, CEC, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, total nitrogen, calcium carbonate, organic matter, moisture, and porosity were 7.76, 36.62 cmol.kg<sup>-1</sup>, 20 mg.kg<sup>-1</sup>, 1.4 mg.kg<sup>-1</sup>, 12.25%, 0.36%, 35.8 %, and .52 % respectively.

Average concentrations of heavy metals in the wastewater, drainages, simulated solution and sludge are shown in table 1. The uptake of heavy metals by plants in plot 4, 3, 2 and 1 is shown in Figures 1 – 4.

Correlation coefficient among metals in all plants was determined by SPSS software. Results are shown in table 2.

According to figure 1, accumulation of Ni in the plants was higher than other metals. The highest concentration of Ni was obtained in alfalfa: 8.905 mg.kg<sup>-1</sup>. Lead similarly to nickel accumulated in high amount in most of studied plants. The highest concentration of Pb was found in spinach, 5.054 mg.kg<sup>-1</sup>. In radish high content of Fe, 3.870 and in spinach high content of Cd, 1.093, Zn 1.050, Cu 0.199 and Cr 1.004 mg/kg were found.

Relative efficiency of crops to absorb metals from soil in plot 4 is arranged in the following order:

Ni: alfalfa > spinach > lettuce > cress > radish > basil > watermelon > tomato

Pb: spinach > alfalfa > radish > lettuce > basil > cress > watermelon > tomato

Fe: radish > spinach > alfalfa > cress > lettuce > basil > watermelon > tomato

Cd: spinach > lettuce > cress > basil > radish > alfalfa > watermelon > tomato

Cu: lettuce > spinach > cress > radish > alfalfa > watermelon > basil > tomato

Cr: spinach > alfalfa > cress > lettuce > basil > radish > tomato > watermelon

As the results showed, spinach, alfalfa and lettuce absorbed the highest concentrations of metals. Radish, cress and basil were in the next place. The least concentration of heavy metals was found in watermelon

**Table 1** Average concentrations of heavy metals in the wastewater, drainages, simulated solution (mg.l<sup>-1</sup>) and sludge (mg.kg<sup>-1</sup>)

Sample / Heavy metal	Pb	Cd	Zn	Cu	Fe	Ni	Cr
Treated effluent Shoush plant	0.3	0.01	0.15	0.04	1.3	0.1	0.07
Drainages of south of Tehran	0.12	0.02	0.75	0.12	1.36	2.98	0.32
Simulated solution of heavy metals	1.2	0.2	7.5	1.2	13.6	29.8	3.2
Sludge	185	10	40	210	780	190	60

**Table 2.** Pearson's correlation coefficients between the heavy metals concentration in the plants

Mean of heavy metals	Ni	Fe	Pb	Cd	Zn	Cu	Cr
Ni	1						
Fe	0.446	1					
Pb	-0.054	0.399	1				
Cd	0.630	0.596	0.218	1			
Zn	0.489	0.262	-0.470	0.724(*)	1		
Cu	0.620	0.101	-0.242	0.398	0.587	1	
Cr	0.528	0.548	0.347	0.968(**)	0.645	0.361	1

\*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

and tomato. Heavy metals are easily accumulated in the edible parts of leafy vegetables, as compared to grain or fruit crops (Mapanda et al. 2005). The result of other study showed, that wastewater-irrigated spinach has shown significantly higher accumulation of iron, copper and zinc, compared to the freshwater-irrigated spinach, indicating the highest metal absorption for this vegetable (Arora et al. 2008).

The range of various metals in the plants in plot 3 was 1.23-8.541, 0.041-5.240, 0.955-3.075, 0.013-2.364, 0.024-1.974, 0.009-1.007, 0.005-1.054 mg.kg<sup>-1</sup> for Ni, Fe, Pb, Cd, Zn, Cu, Cr, respectively. The highest mean levels of Fe, Cd, Zn, Cu, and Cr were detected in spinach whereas the levels of Ni and Pb were highest in lettuce and radish (fig.2).

In plot 2 the highest accumulation of Ni, Fe, Pb, Cd, Zn, Cu, and Cr was found in order alfalfa 8.802, radish 7.790, spinach 1.97, spinach 1.025, cress 0.994, lettuce 0.987 and spinach 0.997 mg.kg<sup>-1</sup>.

In plot 1 the highest concentration of heavy metals was detected in spinach for Ni (4.552) mg.kg<sup>-1</sup> and the least one in watermelon for Cr (.001) mg.kg<sup>-1</sup>. The results of uptake of heavy metals in plot 2 and 1 are shown in figures 3 and 4.

The findings of this study showed that uptake of heavy metals by plants increased in plot 4 and 3. Therefore using wastewater for long-term and several years irrigation (plot 3) increased heavy metal contents in soil, therefore vegetable crops grown on these soils can absorb relatively

high amounts of heavy metals. Usage wastewater and sludge simultaneously (plot 4) increased metal contents in soil and plants and these vegetables can be unsafe for human consumption.

Permissible Standard Limit (PSL) of Pb in plants for human is 5 mg.kg<sup>-1</sup> (Alloway, 1990). Lead uptake of the plants in all plots was lower than PSL, except spinach in plot 4.

Standard value of Cd is 0.1 mg.kg<sup>-1</sup> (Zuan1990). Accumulation of Cd in most of crops in plot 2, 3 and 4 was more than 0.1 mg.kg<sup>-1</sup> (except watermelon and tomato) but in plot 1 accumulation of Cd in all plants except spinach, was lower than standard value. Harmful value for Cr in plants for human is more than 1 mg.kg<sup>-1</sup> (Kabata and Pendis 1984). Uptake of Cr, Cu, Zn and Fe in all plants was found lower than standard value (except Cr in spinach in plot 3 and 4).

Concentration of Ni in all plants is more than standard value. The most concentration of Ni was in Spinach, alfalfa, lettuce and then radish, cress, basil, and the lowest was found in watermelon and tomato. All studied crops were contaminated with Ni, Pb and Cd and partially and or totally exceeded the permissible limits set

by WHO.

Correlation coefficient among metals in all of plants was determined by SPSS software – in the Material and Methods. Results showed highly positive and significant P<0.01 correlation coefficients between Cr and Cd (r =0.968\*\*) and significant P<0.05 correlation coefficients between Zn and Cd (r=0.724\*) in the plants. In other words, these results indicated that the increase of Zn in plants may affect the concentration of Cd. (table 2)

Page et al. (1981) published that Zn has been found to have an antagonism effect according to Cd uptake from soils with low Cd concentrations and a synergistic effect with relatively high Cd content. For our study, because of high Cd content, Zn had a synergism effect.

Our results are in agreement with previous studies concerning elevated levels of heavy metals in edible parts of food crops with continuous wastewater irrigation (Khan et al. 2007, Muchuweti et al. 2006, Sharma et al. 2007, Arora et al. 2008).

Furthermore, our results showed that continuous wastewater irrigation and sludge application led to elevated levels of heavy metals in soils and in edible parts of food crops. Heavy metals accumulation by vegetables is a cause of serious concern due to the potential public health impacts (Bi et al. 2006).

Dietary intake of food results in long-term low level body accumulation of heavy metals and the detrimental impact becomes apparent only after several years of exposure. Thus regular monitoring of these toxic heavy metals from



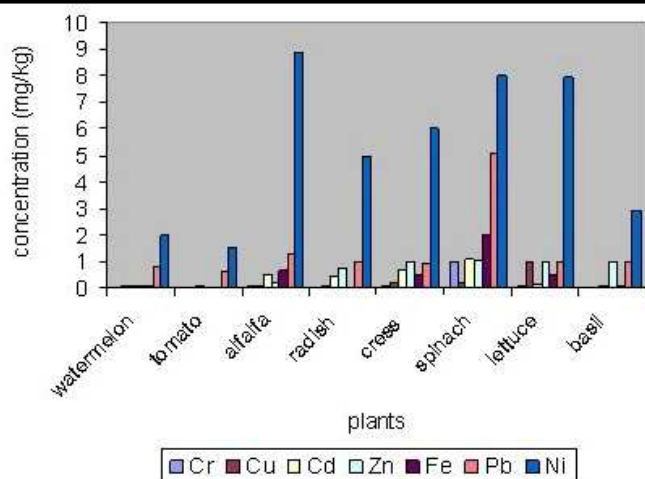


Fig. 1 Comparison of heavy metals uptake in plants of plot 4

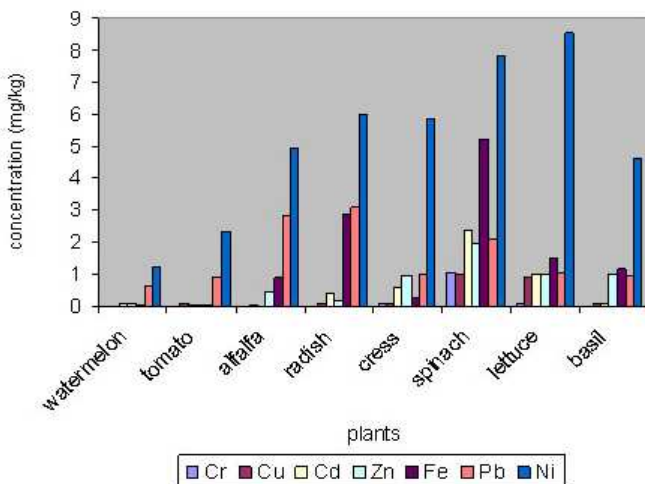


Fig. 2 Comparison of heavy metals uptake in plants of plot 3

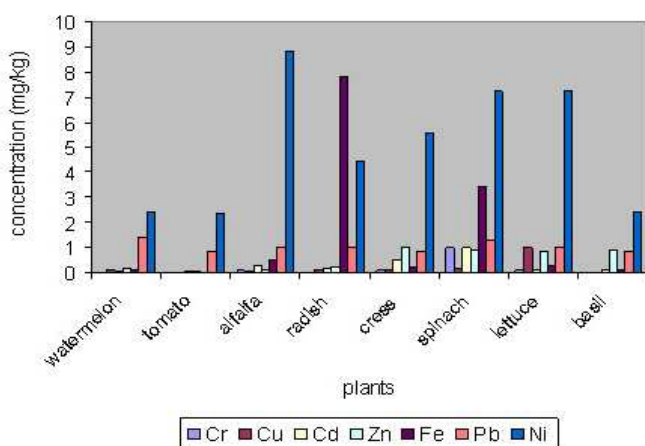


Fig. 3 Comparison of heavy metals uptake in plants of plot 2

effluents and sewage, in vegetables and in other food materials is essential to prevent their excessive build up in the food chain. Also, crop species exercise differentially in metal accumulations in their tissues; therefore selection of plants for using sewage sludge can be effective.

REFERENCES

ALLOWAY, B. J. 1990. Heavy metals in soils. John Wiley and Sons, New York, 1990, p. 20-27.

ARORA, M., KIRAN, B., RANI, S., KAUR, B., MITTAL, N. 2008. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. In *Food Chem.* vol.111, 2008, p. 811-815.

BERGKVIST, P., BERGGREN, D., JARVIS, N. 2005. Cadmium solubility and sorption in along term sludge amended arable soil. In *J. Environ. Qual.*, vol. 34, 2005, p. 1530-1538.

BI, X., FENG, X., YANG, Y., LI, G., LI, F., LIU, T., FU, Z., JIN, Z. 2006. Environmental contamination of heavy metals from zinc smelting areas in Hezhang County, Western Guizhou, China. In *Environ. Int.* vol. 32, 2006, p. 883-890.

CAPCAROVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A., ARPAŠOVÁ, H., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J. 2009. Correlations between some blood biochemical parameters of laying hens after experimental nickel administration. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 12, 2009, p. 96-106.

CHANEY, R. L. 1994. Trace metal movement in soil-plant systems and bioavailability of biosolids. In: Clapp, C. E., editor. Sewage sludge land utilization and the environment. Soil Sci. Soc. Amer. Pub. Madison, Wisconsin pp. 27-31.

CHEN Y., WANG, C., WANG, Z. 2005. Residues and source identification of persistent organic pollutants in farmland soils irrigated by effluents from biological treatment plants. In *Environ. Int.*, vol. 31, 2005, p. 778-783.

DATTA, S. P., BISWAS, D. R., SAHARAN, N., GHOSH, S. K., RATTAN, R. K. 2000. Effect of long-term application of sewage effluents on organic carbon, bioavailable phosphorus, potassium and heavy metals status of soils and uptake of heavy metals by crop. In *Indian Soc. Soil Sci.*, vol. 48, 2000, p. 836-839.

HORWITZ, W. 2000. Official methods of Analysis of AOAC. In: Metals and other elements, 17nd ed. *AOAC Int.* p 22-27.

IKEDA, M., ZHANG, Z. W., SHIMBO, S., WATANABE, T., NAKATSUKA, H., MOON, C. S., MATSUDA-INGOUCI, N., HIGASHIKAWA, K. 2000. Urban population exposure to lead and cadmium in east and south-east Asia. In *Sci. Environ.*, vol. 249, 2000, p. 373-384.

KABATA, A., PENDIS, H. 1984. Trace element in soil and plants. Florida:CRC pree, Boca Raton., pp.57-65

KHAN S., CAO, Q., ZHENG, Y., HUANG, M. Y. G., ZHU, Y. G. 2008. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. In *Environ. Pollut.*, vol. 152, 2008, p. 686-692.

KOLESAROVA, A., CAPCAROVA, M., ARPASOVA, H., KALAFOVA, A., MASSANYI, P., LUKAC, N., KOVACIK, J., SCHNEIDGENOVA, M. 2008. Nickel-induced blood biochemistry alterations in hens after an experimental peroral administration. In *Journal of Environmental Science and Health; Part B*, vol. 43, 2008, no. 7, p. 625-632.

MAPANDA F., MANGWAYANA., E. N., YAMANGARA, J., GILLER, K. E. 2005. The effect of long-term irrigation using water on heavy metal contents of soils under vegetables. In *Agric. Eco. Environ.*, vol. 112, 2005, p. 41-48.

MUCHUWETI, M., BIRKETT, J. W., CHINYANGA E., ZVAUYA, R., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. 2006. Heavy metal content of vegetables irrigated with mixture of wastewater and sewage sludge in Zimbabwe: implication for human health. In *Agric. Eco. Environ.*, vol. 112, 2006, p. 41-48.

PAGE, A. L., BINGHAM, F. T., CHANG, A. C. 1981. Effect of heavy metal pollution of plants, In *Applied Sci*, vol. 1, 1981, p. 72-109.



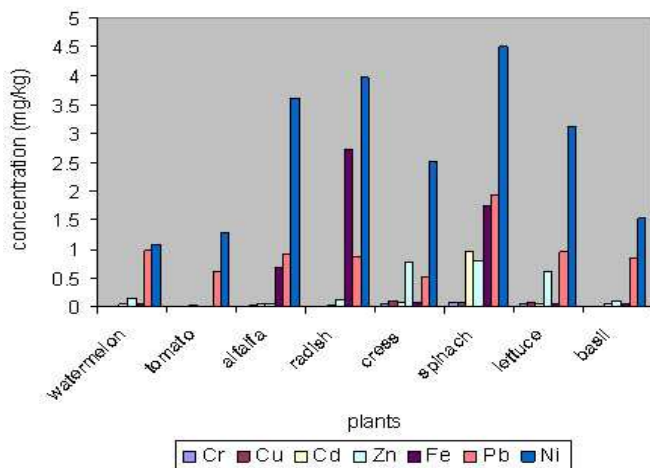


Fig. 4 Comparison of heavy metals uptake in plants of plot 1

RATTAN, R. K., DATTA, S. P., CHHONKAR, P. K., SURBIABO, K., SINGH, A. K. 2005. Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater. In *Agric. Eco. Environ.*, vol. 10, 2005, p. 1-21.

SHARMA, R. K., AGRAWAL, M., MARSHALL, F. 2007. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban

areas of Varanasi, India. In *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 10., 2007, p. 10 – 16.

TORABIAN, A., MAHJORI, M. 2002. Heavy metals uptake by vegetable crops irrigated with wastewater in south Tehran. In: *Proceeding of the International Conference on Science Soil and water*. vol. 16, 2002, Tehran, pp 189-195.

TURKDOGAN, M. K., FEVIZ, K., KAZIM, K., ILYAS, T., ISMAIL, U. 2003. Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. In *Environ. Toxicol. Phamacol.*, vol. 13, 2003, p. 175-179.

ZUANE, P.E. 1990. *Handbook of drinking water quality standards and controls*. Van Nostrand Reinhold, New York, 103.

**Acknowledgment:**

The authors are grateful to the management of Shoush Wastewater Treatment Plant and Chemistry lab of IA University Science and research campus, Tehran Iran.

**Contact address:**

A. Behbahania. Graduate School of the Environment and Energy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, azitabehbahani@yahoo.com

**FERMENTOVANÉ PRODUKTY VO VÝŽIVE ADOLESCENTOV**

**THE ROLE OF FERMENTED PRODUCTS IN ADOLESCENT NUTRITION**

*Izabela Bertková, Darina Petrášová*

**ABSTRACT**

The aim of our study was to describe nutritional status and situation in consumption probiotics products as kefir and yoghurt with bifidobacteria in medical students. Two hundred and forty for the first class medical students at the age of 18-25 years formed a set. Respondents were invited to complete a questionnaire, consisting of questions about consumption fermented milk product. Over half of all asked men (53,85%) consumed yoghurt a few times a week. On the other side yoghurt absent in diet 28,2% of men. High percentage of men (48,72%) never consumed kefir. The majority of women (71,69%) consumed yoghurt a few times a week. Only 8,43% of women never consumed yoghurt. Forty percent of women indicated they would be willing to use the kefir as part of their daily self-care. Fifty four women (32,53%) never consumed kefir. High percentage of students consumed yoghurt with bifidobacteria a few times a week. As well as men and women preferred consumption yoghurt before kefir and half of men never consumed kefir. These results suggested that appropriate nutritional education about fermented dairy products is important in medical students.

**Keywords:** yoghurt with bifidobacteria, kefir, health, nutrition

**ÚVOD**

Viacere epidemiologické štúdie potvrdzujú, že množstvo chronických a infekčných ochorení súvisí so stravou. Zvýšená konzumácia tukov a mäsa a na druhej strane nízky príjem ovocia, zeleniny, vlákniny a mliečnych produktov zvyšuje riziko nádorových ochorení, najmä rakoviny hrubého čreva (Hijová, Chmelárová, 2008). Predpokladá sa, že viac ako 30% kardiovaskulárnych ochorení vzniká v dôsledku nevyváženej stravy a vzniku viac ako 35% onkologických ochorení sa dá predísť úpravou výživy formou potravinových doplnkov, doplnkov stravy, či funkčnými potravinami (La Société Francaise de Santé Publique, 2000).

Funkčné potraviny predstavujú skupinu potravín, ktoré majú preukázateľne priaznivý vplyv na fyzické a duševné zdravie človeka a pomáhajú znižovať ohrozenie rôznymi chorobami, čiže okrem výživového efektu zlepšujú zdravotný stav a znižujú riziko chorôb (Contor, 2001).

Deklarované zdravotné účinky fermentovaných funkčných potravín súvisia s priamou aktivitou živých probiotických organizmov prijatých potravou s hositeľom (probiotický efekt), ako aj nepriamo pôsobením metabolitov produkovaných počas procesu fermentácie (biogénny efekt) (Meisel, 1998; Stanton et al. 2005). Baktérie mliečneho kysnutia utvárajú v čreve mikroprostredie, ktoré bráni pomnoženiu nielen patogénnych druhov, ale aj rôznych hnilobných a menej prospešných baktérií. Zo zdravotného hľadiska sú najprospešnejšie baktérie mliečneho kysnutia ako napr. laktobacily (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. Johnsonii*), bifidobaktérie (*B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*), niektoré streptokoky a enterokoky (*E. faecium*, *E. faecalis*), ktoré skvasujú laktózu a iné cukry na karboxylové kyseliny s krátkym reťazcom (mliečnu, octovú, propiónovú, maslovú), produkujú vitamíny skupiny B vrátane vitamínu B12 ako aj vitamínu K a

ďalšie látky potrebné pre hostiteľa (Heller, 2001). Z ďalších vlastností mliečnych baktérií spomeňme aspoň ich schopnosť dehydroxylovať a dekonjugovať žlčové kyseliny, čím bránia ich premene na fekálne sekundárne žlčové kyseliny (význam v patogenéze rakoviny hrubého čreva) (Ferenčík et al., 1999).

Denný príjem mikroorganizmov, ako sú laktobacilov a bifidobaktérií, ktoré sú prítomné hlavne vo fermentovaných mliečnych produktoch, prispieva k udržaniu a zlepšeniu rovnováhy črevnej mikrobiálnej populácie a ich prítomnosť zlepšuje imunitné funkcie, predchádza gastrointestinálnym poruchám a zlepšuje celkové zdravie organizmu (Bomba et al. 2006; Heller, 2001; Szabadosová et al. 2009).

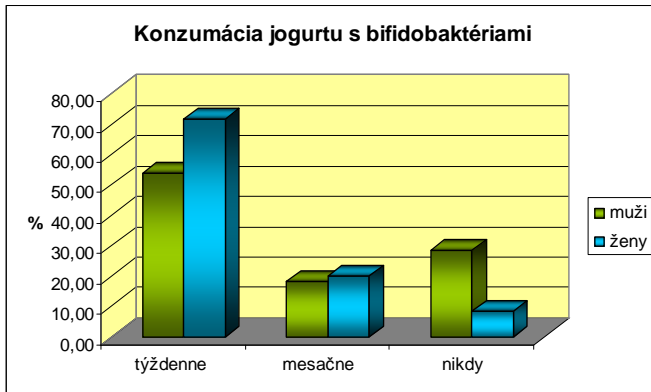
Medzi najpopulárnejšie fermentované mliečne produkty sú zaraďované jogurt, acidofilné mlieko a kefír. Vyznačujú sa viacerými zdravotnými benefitmi, z ktorých najčastejšie

uvádzanými sú hypoalergénne účinky proti mliečnej bielkovine, zvýšenie vstrebávania vápnika a iných minerálov a vitamínov (Hekmat, Koba, 2006), zlepšenie intolerancie laktózy, redukcia črevných infekcií, stimulácia imunitného systému (Isolauri, 2001), antikarcinogénna aktivita (Abd El-Gawadi et al. 2004), redukcia sérového cholesterolu.

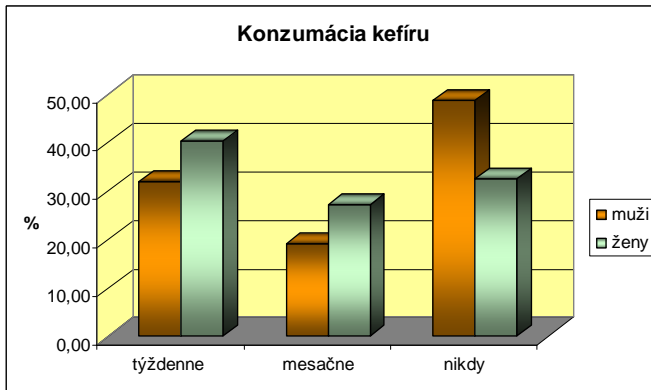
Jogurt je najznámejší potravinový nosič probiotík. Tradične sú v jogurte prítomné kultúry *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. V poslednom období sú najčastejšími kultúrami pridávanými do jogurtu počas výroby na zlepšenie jeho probiotických vlastností *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* a *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* (Kuchta et al. 2006). Tieto baktérie sú zaradené k probiotikám, pretože prechádzajú žalúdkom a ďalšou časťou tráviaceho systému neporušené a zostávajú nažive.

Kefír je produktom fermentácie mlieka kefírovými zrnami. Zloženie kefírových zrn je variabilné, nie je presne definované, je poznačené napr. aj regionálnymi rozdielmi. Kefírové zrná sú považované za výsledok symbiotickej asociácie medzi mliečnymi a octovými baktériami a kvasinkami. Na rozdiel od acidofilného mlieka sa na tvorbe tejto asociácie kefírových zrn zúčastňuje najmenej 20 druhov mikroorganizmov (Kuchta et al. 2006; Vinderola et al. 2006). Kefír obsahuje ľahko tráviiteľné proteíny a dôležité vitamíny a minerály.

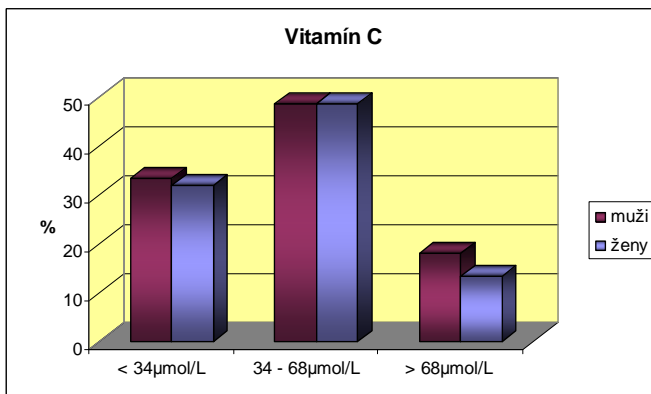
Na problematiku stravovacích zvyklostí, postoj k potravinám a vnímanie ich potrebných zmien v vysokoškolských študentov opakovane poukazujú práce viacerých autorov (Bernasovská et al. 2003; Holéczyová et al. 2005). Cieľom našej práce bolo popísať stav vo výžive a konzumácii probiotických produktov – ako sú kefír a jogurt s bifidokultúrou u študentov medicíny.



Graf 1. Konzumácia jogurtu s bifidobaktériami v súbore študentov.



Graf 2 Konzumácia kefíru v súbore študentov.



Graf 3 Porovnanie koncentrácií vitamínu C v súbore študentov.

## MATERIÁL A METODIKA

Súbor tvorilo 244 študentov prvého ročníka Lekárskej fakulty UPJŠ (166 žien a 78 mužov) vo veku 18-22 rokov. Respondenti vypracovali dotazník s otázkami zameranými na konzumáciu fermentovaných mliečnych produktov – kefíru a jogurtu s bifidobaktériami. U študentov sme stanovovali antropometrické parametre – obvod pásu, pomer pás/boky (WHR index), hmotnosť a výšku, z ktorých sme vypočítali body mass index - BMI. Koncentrácie vitamínu C sme stanovovali spektrofotometrickou metódou Roe a Kuethera.

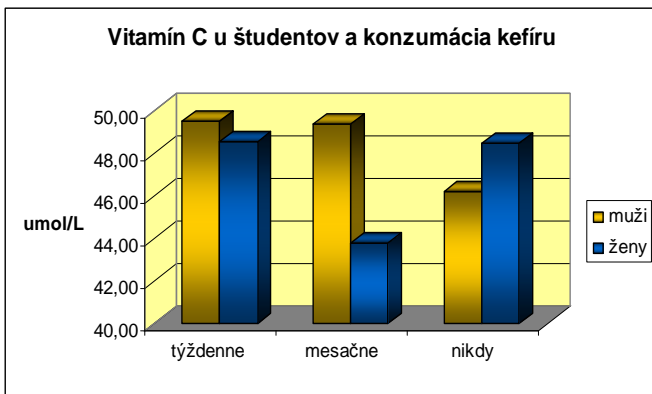
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyhodnotením dotazníka sme zistili nasledovné skutočnosti. Na otázku ako často konzumujú jogurt s probiotickou kultúrou uviedlo 71,69% žien jeho konzumáciu niekoľkokrát do týždňa (graf 1). Len 8,43% žien nekonsumovalo jogurt vôbec. Viac než dve tretiny zo všetkých opýtaných mužov konzumuje jogurt niekoľkokrát do týždňa. Na druhej strane jogurt absentuje v strave 28,2% mužov. Približne rovnaké percento mužov aj žien (okolo 20%) konzumuje jogurt s probiotickou kultúrou mesačne.

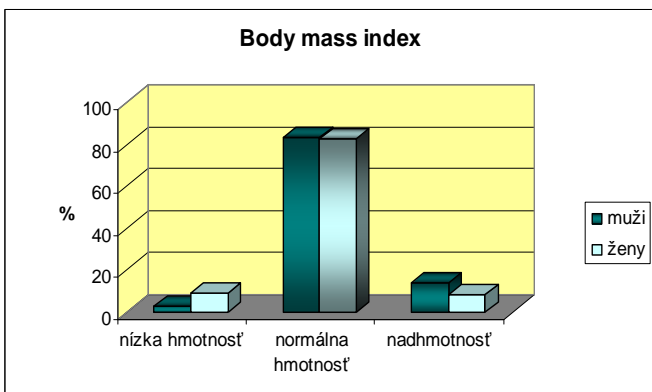
Rozdiely v konzumácii kefíru medzi mužmi a ženami znázorňuje graf 2. Štyridsať percent žien udávalo, že kefír tvorí súčasť ich stravy ako denná starostlivosť o svoje zdravie. Kefír vôbec nekonsumuje 32,53% žien. Vysoké

percento mužov (48,72%) nikdy nekonzumuje kefír. Konzumáciu kefíru niekoľkokrát do týždňa udáva 25 mužov (32,05%). Skoro rovnaký počet mužov konzumuje jogurt a kefír mesačne. Z uvedených výsledkov vyplýva, že kefír je u medikov najmenej obľúbeným fermentovaným mliečnym produktom. V našom súbore ho vysoké percento žien a mužov nekonzumuje vôbec, pričom podobné výsledky sme zistili aj u poslucháčov 4. ročníka medicíny. Percentuálne zastúpenie mužov a žien v troch skupinách vytvorených podľa hodnôt vitamínu C: menej než 34  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (znížené hodnoty vitamínu C); 34-68  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (fyziologické rozpätie hodnôt) a viac ako 68  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  vitamínu C znázorňuje graf 3. V pásme fyziologických hodnôt sa nachádzalo približne 50% mužov aj žien. Znížené hodnoty vitamínu C malo 33,33% mužov a 31,93% žien. Pri sledovaní vzťahu medzi koncentráciou vitamínu C a konzumáciou kefíru v súbore adolescentov sme zistili, že koncentrácia vitamínu C je vyššia u mužov, ktorí konzumujú kefír v porovnaní s mužmi nekonzumujúcimi kefír vôbec (graf 4).

Z nameraných antropometrických parametrov - hmotnosti a výšky sme vypočítali BMI. Graf 5 znázorňuje percentuálne zastúpenie mužov a žien v troch skupinách vytvorených podľa hodnôt BMI: nízka hmotnosť, normálna hmotnosť a nadhmotnosť. Nízkou hmotnosť (t.j.  $\text{BMI} < 18,5 \text{ kg.m}^{-2}$ ) malo 2,56% mužov, normálnu hmotnosť ( $\text{BMI} 18,5 - 24,9 \text{ kg.m}^{-2}$ ) malo 83,33% a nadhmotnosť ( $\text{BMI} 25,0 - 29,9 \text{ kg.m}^{-2}$ ) malo 14,11% mužov. V súbore boli dvaja muži s obezitou I. stupňa ( $\text{BMI} 30,0 - 34,9 \text{ kg.m}^{-2}$ ). U žien malo nízku hmotnosť 8,99%, normálnu hmotnosť 82,63% a nadhmotnosť 8,38%. V skupine žien sa vyskytla obezita I. stupňa - v jednom



Graf 4 Vzťah medzi koncentráciou vitamínu C a konzumáciou kefíru v súbore študentov.



Graf 5 Percentuálne zastúpenie hodnôt body mass indexu v súbore študentov

prípade ( $\text{BMI} = 30,12 \text{ kg.m}^{-2}$ ).

Pomer obvodu pása k obvodu bokov (WHR index) je dobrým ukazovateľom rozloženia tuku v tele. Čím je tento pomer vyšší (u mužov viac ako 0,95 a u žien viac ako 0,85), tým sa predpokladá väčšie riziko rozvoja kardiovaskulárnych chorôb. Podľa vypočítaného WHR indexu bolo do kategórie so zvýšeným rizikom zaradených 10,26% mužov a 20,48% žien.

Zaujímavé je zistenie, že aj keď u mužov v sledovanom súbore bol zistený vyšší výskyt nadhmotnosti než u žien, podľa indexu WHR bolo v kategórii so zvýšeným rizikom zaradených viac žien než mužov.

Podobne ako WHR index, aj veľkosť obvodu pása vyjadruje mieru rizika pre rozvoj metabolických a kardiovaskulárnych chorôb. Veľkosti obvodu pása spojené so zvýšením zdravotného rizika vzniku chorôb sú u mužov nad 94 cm a u žien nad 80 cm. Rizikové hodnoty obvodu pása dosiahlo v našom súbore viac žien (podobne aj WHR index) ako mužov (9 žien oproti 2 mužom).

## ZÁVER

Zloženie črevnej mikroflóry sa mení počas ontogenézy nielen v závislosti od veku, ale aj od životného štýlu a environmentálnych faktorov. Zostavu črevnej mikroflóry možno upravovať preferenciou potravín podporujúcich zdravie, napríklad niektorými funkčnými potravinami obsahujúcimi probiotické mikroorganizmy. Z nami uskutočneného prieskumu medzi študentmi vyplynulo, že vysoké percento z nich konzumuje jogurt s bifidobaktériami niekoľkokrát do týždňa. Ako muži, tak aj ženy upredostňujú konzumáciu jogurtu pred kefírom, ale až polovica mužov nikdy nekonzumuje kefír. Tieto výsledky poukazujú na vhodnosť a dôležitosť vzdelávania ohľadom fermentovaných mliečnych produktov a ich výživových a zdravotne prospešných efektoch u študentov medicíny. Táto osвета môže zvýšiť ich prijateľnosť a konzumáciu.

## LITERATÚRA

ABD EL-GAWADI, I. A., EL-SAYEDI, E. M., HAFEZ, S. A., EL-ZEINI, H. M., SALEH, F. A. 2004. Inhibitory effect of yoghurt and soya yoghurt containing bifidobacteria on the proliferation of Ehrlich ascites tumour cells in vitro and in vivo in a mouse tumour model. In *British Journal of Nutrition*, 2004, č. 92, s. 81-86.

BERNASOVSKÁ, K., RIMÁROVÁ, K., KOVÁŘOVÁ, M. 2003. Posúdenie životného štýlu poslucháčov lekárskej fakulty UPJŠ v Košiciach. In *Životné podmienky a zdravie*, Bratislava, ŠFZÚ, 2003, 384 s., s. 273-279, ISBN 80-7159-138-6.

BOMBA, A., BULECA, V., GANCARČIKOVÁ, S., JONECOVÁ, Z., KAŠTEL, R., KOŠČOVÁ, J., LAZAR, G., MAREKOVÁ, M., MUDROŇOVÁ, D., NEMCOVÁ, R., POŠIVÁK, J., SCIRANKOVÁ, Ľ. 2006. The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: a review. In *Biologia*, Bratislava, roč. 61, 2006, č. 6, s. 729-734.

CONTOR, L. 2001. Functional food science in Europe. In *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, roč.4, 2001, č.11 (Suppl), s. 20 - 23.

FERENČÍK, M., EBRINGER, L., MIKEŠ, Z., JAHNOVÁ, E., ČIŽNÁR, I. 1999. Beneficial modification of the human intestinal microflora using orally administered lactic acid bacteria. In *Bratisl. Lek. Listy*, 1999, č. 100, s. 238-245.

- HEKMAT, S., KOBA, L. 2006. Fermented dairy products: knowledge and consumption. In *Can. J. Diet. Pract. Res.*, roč. 4, 2006, č. 67, s. 199-201.
- HELLER, K. J., 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. In *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, č. 73 (Suppl), s. 374-379.
- HIJOVÁ, E., CHMELÁROVÁ, A. 2008. The risk of cancer in relationship to diet. In *Bratisl. Lek. Listy*, roč. 7, 2008, č. 109, s. 320-323.
- HOLÉCZYOVÁ, G., BERNASOVSKÁ, K., RIMÁROVÁ, K. 2005. Kohortová štúdia stravovacích návykov a percepcie ich zmien u študentov LF. In *Životné podmienky a zdravie*, 2005, 394 s. s. 206-209, ISBN 80-7159-157-2.
- ISOLAURI, E. 2001. Probiotics in human disease. In *Am J Clin. Nutr.*, 2001, č. 73 (Suppl), s. 1142-1146.
- KUCHTA, M., PRUŽINEC, P. et al., 2006. Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne. Bonus CCS, s.r.o., 2006, s. 47 – 68, ISBN 80-968491-7-4.
- LA SOCIÉTÉ FRANCAISE DE SANTÉ PUBLIQUE, 2000. Health and Human Nutrition: Elements for European Action, 2000, (www.sfsp-france.org).
- LAVERMICOCCA, P. 2006. Highlights on new food research. In *Dig. Liver. Dis.*, roč. 38, 2006, č. 2 (Suppl), s. 295-299.
- MEISEL, H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. In *Int. Dairy J.*, 1998, č.8, s. 363-373.
- STANTON, C., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., VAN SINDEREN, D. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. In *Curr Opin Biotechnol.*, roč. 2, 2005, č.16, s. 198-203.
- SZABADOSOVÁ, V., HIJOVÁ, E., BOMBA, A. 2009. Koncept probiotík a prebiotík v prevencii chorôb. In *Slovenský lekár*, 2009, v tlači.
- VINDEROLA, G., PERDIGÓN, G., DUARTE, J., FARNWORTH, E., MATAR, C. 2006. Effect of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. In *J. Dairy Res.*, roč. 4, 2006, č. 73, s. 472 –479.

### Pod'akovanie:

Práca bola realizovaná vďaka podpore grantov AV 4/0028/07 a VEGA 1/4232/07

### Kontaktná adresa:

Mgr. Izabela Bertková. Ústav experimentálnej medicíny, LF UPJŠ v Košiciach, Tr. SNP 1, 04011, Košice. Tel.: 055-6424606 E-mail: izabela.bertkova@upjs.sk

## EFFECT OF EXPOSURE TO HIGH AMBIENT TEMPERATURE ON SELECTED BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RABBITS

*Marcela Capcarová, Norbert Lukáč, Juraj Pivko, Ľubomír Ondruška, Peter Massányi, Adriana Kolesárová*

### ABSTRACT

The aim of the study was to determine the effect of high ambient temperature on the selected biochemical parameters in rabbits. Animals of control group were kept in thermoneutral rooms and experimental group in room with high ambient temperature (38°C). Selected biochemical parameters of blood were determined using automatic analyzer Microlab 300 and microprocessor-controlled analyzer EasyLite. In experimental group of animal expressive hypercholesterolemia, decreased concentration of calcium, increase of chloride concentration, was observed. High ambient temperature caused 26% mortality. Post-necropsy investigation confirmed lungs venostasis, catarrhal bronchopneumonia and hepatodystrophy. This study showed that the exposure of rabbits to high ambient temperature can aggravate homeostasis of internal milieu of animals.

**Keywords:** high ambient temperature; biochemistry; rabbits; physiology

### INTRODUCTION

The number of reports on the effects of heat stress is still increasing on account of the temperature is one of the most encountered stressful factors on the different biological systems (Ahmed, 2005). All homoeothermic animals maintain a constant body temperature over a wide range of ambient temperatures (Geraert et al., 1996). Recent studies have shown that rabbits are very sensitive to extreme environmental condition what includes ambient temperature as well (Naqvi et al., 1995; Okab et al., 2008). Rabbits suffer on heat stress causing deterioration in some physiological functions including feed intake, haematological constituents and biochemical parameters during summer season (Okab et al., 2008).

Animal studies show that nervous tissue is sensitive to heat (Sharma and Hoopes, 2003; Haveman et al., 2004; Haveman et al., 2005; Ahmed et al., 2005; Frosini, 2007; Hosako et al., 2009). The disturbance in the biochemical variables due to the high temperature may be the cause of the histopathological changes and the partial retardation in CNS and the reverse is true (Ahmed, 2005).

The main feature of acute heat damage (49-52°C) in rabbit urethra was necrosis or vascular congestion or thrombosis of blood vessels of the urethral wall (Huang et al., 2009). Protein denaturation and aggregation has been shown to occur in cells during heat shock and is closely correlated with the cellular responses to hyperthermia (Lepock, 2005; Lepock, 2003; Ritchie et al., 1994). Heat shock pre-treatment can ameliorate the oxidative stress produced by a metabolic toxin (Medina-Navarro and Guerrero-Linares, 2009). All production parameters of hens and pullets were severely affected by heat stress (Mashaly et al., 2004; Minka and Ayo, 2008). Pigs in high ambient temperature gained less weight and consumed less feed than pigs in neutral ambient temperature (Kim et al., 2009). It has been reported that heat stress inhibited immune function and reduced number and activity of leucocytes in laying hens (Mashaly et al., 2004) and resulted in restraint of the development of immune organs of broilers (Guo et al., 1998). Heat stress induced the reduction in red blood cells count, haemoglobin, packed

cell volume and caused disturbances in some biochemical parameters in rabbit blood (Okab et al., 2008).

The aim of the present investigation was to determine the effect of high ambient temperature on the health status and selected biochemical parameters of rabbits.

### MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed at Slovak Agricultural Research Centre in Nitra and Department of Animal Physiology, Slovak Agricultural University in Nitra. Fifty rabbits of meat line M91, maternal albinotic line, crossbreed (Newzeland white, Buskat rabbit, French silver) and paternal acromalictic line, crossbreed (Nitra's rabbit, Californian rabbit, Big light silver) were used in experiment. Two rooms, one set at 20°C (thermoneutral) and one set at 38°C during 12 hours (6<sup>00</sup>-18<sup>00</sup>) for 26 days were established. Experimental temperature was adjusted on day 1 (beginning of the experiment). Thermo aggregate was installed and experimental conditions with defined high temperature were simulated by sensor in closed rooms. Simulated conditions were monitored continually. Rabbits were healthy and their condition was judged as good at the commencement of the experiment. Animals in individual sectors of rearing cages with feeding and water system *ad libitum* were divided into two groups of 25 each, which were separately kept in different rooms. Animals of control group (C) were kept in thermoneutral room and one experimental group (E) in room with high ambient temperature.

Group of animals were balanced for age and body weight ( $4 \pm 0.5$  kg) at the beginning of the experiment. Rabbits were fed on a 12.35 MJ.kg<sup>-1</sup> of metabolizable diet composed of a pelleted concentrate. Water was available at any time for both groups from automatic drinking troughs. The health condition of rabbits was controlled daily before the morning feeding around 8:00 a.m. Mortality was recorded when occurred and perished animals were sent to State Veterinary and Food Institute in Nitra, Slovak Republic for examination and autopsy.

Blood samples from *vena auricularia* were taken from all animals by macromethods in morning 5 times during whole experimental period at days 5, 12, 19 and 26. Blood samples were centrifuged for 30 min at 3000xg and blood plasma was obtained. The following metabolites and enzymes in plasma (total proteins, glucose, cholesterol, calcium, sodium, potassium, chlorides, alanine aminotransferase - ALT and glutamatdehydrogenase - GLDH) were determined with Ecoline kits using automatic analyzer Microlab 300 (Merck®, Germany) and microprocessor-controlled analyzer EasyLite (Medica, Bedford, USA).

To compare the results the analysis of variance, t-test and Duncan's test were used to calculate basic statistic characteristics and to determine significant differences between experimental and control groups in the SAS statistical software. Differences were compared for statistical significance at the levels  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ .

### RESULTS

The rate of mortality in control group was not observed. Hyperthermic environment had unfavourable impact on decrease of experimental animals' vitality of what

evidence is increased mortality. In experimental group 26 % rate of mortality was recorded. Perished animals were subjected to pathologic, bacteriologic and parasitological examination. The common diagnosis was lungs venostasis, catarrhal bronchopneumonia and hepatodystrophy.

Concentrations of selected biochemical parameters of rabbits are shown in table 1. The values of total proteins concentration in control group were more balanced than those in experimental group. In experimental group of animals the concentration of total proteins was the highest on the beginning of experiment, gradually decreased and the lowest was in the end of experiment. Significant ( $P < 0.05$ ) decrease of this parameter in experimental group when compared with control group was observed in all days of blood taking. The exposure of animals to high ambient temperature did not influence the concentration of glucose as differences between groups were not significant ( $P > 0.05$ ). The concentration of cholesterol in experimental group was significantly higher ( $P < 0.001$ ) than those in control group. In experimental group the content of cholesterol in each measurement went up the physiological limit (Boyd, 1984).

High ambient temperature decreased the concentration of calcium in experimental group versus control group in day 5 significantly ( $P < 0.5$ ). The concentration of sodium and potassium was not influenced by virtue of high ambient temperature as the differences between control and experimental group remained insignificant ( $P > 0.05$ ). Values of chlorides were higher in experimental group in comparison with control group. Significant increase ( $P < 0.05$ ) of above mentioned parameter in experimental rabbits when compared with control rabbits was determined at day 12 and day 19.

The concentration of ALT in control and experimental group remained constant during whole experimental period without significant differences ( $P > 0.05$ ). In experimental group at day 19 the activity of enzyme reached the value of  $0.86 \pm 0.46 \mu\text{kat.L}^{-1}$ , whereas reference range was exceeded. In experimental group of rabbits increase in GLDH activity at day 5, 19 and 26 was recorded. In both group values exhibited a trend with time to increase from the lowest at day 12 to the highest at day 26, however, did not reach statistical significance ( $P > 0.05$ ).

### DISCUSSION

It has been reported that the main causes for high ambient temperature exposure are cerebral ischemia (Lin and Lin, 1992), loss of sensation, deep hyperthermia, coma (Shih et al., 1984), hormonal alterations (West, 2003; Rasooli et al., 2009), liver and heart damages (Lin et al., 2006; Yan et al., 2009) and necrosis of animal tissues (Alvarado et al., 2009; Huang et al., 2009). In the present study rabbits were exposed daily to 38°C during 12 hours for 26 days. When rabbits were exposed to chronic hyperthermic stress the most sensitive animals could not regulate their internal milieu and hyperthermic collapse makes an appearance attended by increasing mortality (26 % in experimental group). Similar results were published in the case of laying hens. This increase of mortality could be due to inhibition of immune responses (Mashaly et al., 2004). In the present experiment the consequences of high ambient temperature exposure were lungs venostasis, catarrhal bronchopneumonia and hepatodystrophy.



**Table 1** Biochemical parameters of control group and experimental group of rabbits after different days of high ambient temperature exposure

parameter	Day 5		Day 12		Day 19		Day 26	
	C	E	C	E	C	E	C	E
<b>total proteins</b> (g.l <sup>-1</sup> )	67.94±4.14	61.44±5.39*	69.21±3.96	60.48±4.84*	74.14±4.46	62.92±4.81*	66.48±3.89	59.88±5.59*
<b>glucose</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )	8.05±0.60	8.07±0.36	7.28±0.70	7.37±0.46	6.26±0.71	6.32±0.50	7.65±0.69	7.75±0.69
<b>cholesterol</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )	1.59±0.46	2.96±0.51***	1.88±0.56	3.50±0.74***	1.71±0.56	4.35±1.00***	1.71±0.71	4.30±1.14***
<b>calcium</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )	3.94±0.48	3.65±0.36*	3.18±0.37	3.01±0.33	3.13±0.24	2.96±0.25	3.01±0.19	2.96±0.12
<b>sodium</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )	143.30±1.14	142.30±1.55	143.40±1.39	142.80±1.22	144.20±1.44	144.10±1.92	144.20±1.83	143.80±2.95
<b>potassium</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )	3.90±0.23	4.01±0.33	3.88±0.27	4.00±0.24	3.95±0.29	3.97±0.32	4.08±0.46	4.14±0.45
<b>chlorides</b> (mmol.l <sup>-1</sup> )	104.80±2.06	106.30±2.66	106.20±2.06	109.40±2.32	107.80±1.36	111.30±2.14	109.30±1.22	110.80±1.86
<b>ALT</b> (μkat.l <sup>-1</sup> )	0.74±0.19	0.73±0.23	0.77±0.22	0.73±0.32	0.73±0.21	0.86±0.46	0.72±0.17	0.79±0.38
<b>GLDH</b> (μkat.l <sup>-1</sup> )	0.19±0.07	0.23±0.05	0.15±0.03	0.14±0.03	0.18±0.03	0.19±0.06	0.22±0.03	0.24±0.05

C – control group, E- experimental group (high ambient temperature exposure)

ALT – alanine amino transaminase , GLDH - glutamatdehydrogenase

The values shown are the mean±SD

Significant at \*p<0.05 and \*\*\*p<0.001 level when comparing the high ambient temperature exposed group (experimental) with control group

According to **Sevi et al. (2001)**, exposure of the animals to high ambient temperature has the adverse effect on energy and mineral metabolism. In our experiment the significant (P<0.05) decrease in plasma total proteins in experimental group when compared with control group were measured. This could be a consequence of adrenocorticotrophic stress as it was reported by **Rorick-Kehn et al. (2005)**. Exposure of animal to 38°C ambient temperature had no effect on the glucose concentration in blood. Whole body hyperthermia-treated mice (38°C) showed a significant decrease in blood glucose levels (**Kokura et al., 2007**). Opposite results were reported in experiment with laying hens (**Sahin et al., 2004**). In the present study expressive hypercholesterolaemia in rabbits exposed to high ambient temperature occurred. It may be the result of liver parenchyma damages. These results are similar to those of **Okab et al. (2008)** and **Ayoub et al. (2007)**. Heat exposure also increased concentrations of serum cholesterol in laying hens (**Sahin et al., 2004**). Lipid peroxidation may play a causal role in hyperthermia induced liver toxicity (**Skibba and Gwartney, 1997**). High ambient temperatures can result in plasma mineral imbalance, especially due to reduction in sodium, potassium, calcium and phosphorus and increase in chloride concentration (**Schneider et al., 1988**). It was reported that during heat stress the requirement for mineral elements increases (**West et al., 1987**). In the present study decreased concentration of calcium in experimental group versus control group was observed (in day 5 significantly, P<0.5). Decreased concentration of calcium in the plasma of ewes exposed to high ambient temperature was explained by reducing secretion of parathyroid hormone due to prolonged exposure to high ambient temperature (**Habeeb et al., 1992**). Neither blood concentration of

ionized calcium nor total plasma calcium was affected by high ambient temperature in rabbits (**Frosini et al., 2000**). In this experiment the concentration of sodium and potassium were not influenced by high ambient temperature. The similar results were obtained in rabbits exposed to 40°C (**Frosini et al., 2000**). However, **Sevi et al. (2001)** found depression of mentioned parameters in ewes under high ambient temperature. The reason may be different time of high temperature exposure and other type of animal involved in experiment. Approvingly with **Schneider et al. (1988)**, the increase of chloride concentration in blood of rabbits exposed to high ambient temperature was measured in present study, at days 12 and 19 significantly (P<0.05).

At day 19 the activity of ALT in experimental group exceeded the reference range, what could indicate beginning hepatitis. In experiment with ewes exposed to high ambient temperature lower levels of plasma ALT were found (**Sevi et al., 2001**). ALT activity in rabbits significantly decreased during the summer (**Okab et al., 2008**). In present study increase in GLDH activity was determined what also could indicate possible liver failure.

## CONCLUSION

In conclusion, the present results indicate that chronic exposure to high ambient temperature (38°C) had severe negative effects on the physiological parameters of rabbits. The imbalance in biochemical parameters may be linked to liver damage in response to heat stress.

## REFERENCES

AHMED, R. G. 2005. Heat stress induced histopathology and pathophysiology of the central nervous system. In: *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 23, 2005, no. 6, p. 549-557.



- ALVARADO, R., MAHON, B., VALADEZ, C., CAUFIELD, M., WADHWANI, S., HAMBLETON, C., SIZIOPIKOU, K. P., DICKLER, A. T., GATTA, J., DOWLATSHAHI, K. 2009. Thermal ablation of the goat mammary gland as a model for post-lumpectomy treatment of breast cancer: preliminary observations. In *Int. J. Hyperthermia.*, vol. 25, 2009, no. 1, p. 47-55.
- AYOUB, M. A., OKAB, A. B., KORIEEM, A. A. 2007. Effect of seasonal variations on some haematological and plasma biochemical parameters in Egyptian male and female baladi rabbits. In *The 7<sup>th</sup> inter. conference on rabbit production in hot clim. Ghourdaga, Egypt*, 6-9 December, 2007, p. 509-522.
- BOYD, J. W. 1984. The interpretation of serum biochemistry test results in domestic animals. In *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 13, 1984, no. 2.
- FROSINI, M., SESTI, C., PALMI, M., VALOTI, M., FUSI, F., MANTOVANI, P., BIANCHI, L., DELLA CORTE, L., SGARAGLI, G. 2000. Heat-stress-induced hyperthermia alters CSF osmolality and composition in conscious rabbits. In *Am. J. Physiol. Regul. Inteter. Comp. Physiol.*, vol. 279, 2000, no. 6, p. 2095-2103.
- FROSINI, M. 2007. Changes in CSF composition during heat stress and fever in conscious rabbits. In *Prog Brain Res.*, vol. 162, 2007, p. 449-457.
- GERAERT, P. A., PADILHA, J. C. F., GUILLAUMIN, S. 1996. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: Growth performance, body composition and energy retention. In *Br. J. Nutr.*, vol. 75, 1996, p. 195-204.
- GUO, Y. M., LIU, C. N., ZHOU, Y. P. 1998. Impact of heat stress on broilers and effects of supplemental yeast chromium. In *Acta Vet. Zootech. Sinica*, vol. 29, 1998, p. 339-344.
- HAVEMAN, J., VAN DER ZEE, J., WONDERGEM, J., HOOGVEEN, J. F., HULSHOF, M. C. 2004. Effects of hyperthermia on the peripheral nervous system: a review. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 20, 2004, no. 4, p. 371-391.
- HAVEMAN, J., SMINIA, P., WONDERGEM, J., VAN DER ZEE, J., HULSHOF, M. C. 2005. Effects of hyperthermia on the central nervous system: what was learnt from animal studies? In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 21, 2005, no. 5, p. 473-487.
- HUANG, Y., HU, B., LIU, D., LIU, S. J., SHEN, E., WU, R. 2009. Measuring urethral tissue heat injury temperature of healthy male rabbits during interstitial radiofrequency ablation. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 25, 2009, no. 1, p. 56-64.
- HOSAKO, H., FRANCISCO, L. E., MARTIN, G. S., MIRKES, P. E. 2009. The roles of p53 and p21 in normal development and hyperthermia-induced malformations. In *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.*, vol. 86, 2009, no. 1, p. 40-47.
- KIM, B. G., LINDEMANN, M. D., CROMWELL, G. L. 2009. The effects of dietary chromium (III) picolinate on growth performance, blood measurements, and respiratory rate in pigs kept in high and low ambient temperature. In *J. Anim. Sci.*, 2009 Jan 16. [Epub ahead of print].
- KOKURA, S., ADACHI, S., MANABE, E., MIZUSHIMA, K., HATTORI, T., OKUDA, T., NAKABE, N., HANDA, O., TAKAGI, T., NAITO, Y., YOSHIDA, N., YOSHIKAWA T. 2007. Whole body hyperthermia improves obesity-induced insulin resistance in diabetic mice. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 23, 2007, no. 3, p. 259-265.
- LEPOCK, J. R. 2005. How do cells respond to their thermal environment? In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 21, 2005, no. 8, p. 681-687.
- LEPOCK, J. R. 2003. Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 19, 2003, no. 3, p. 252-266.
- LIN, M. T., LIN, S. Z. 1992. Cerebral ischemia is the main cause for the onset of heat stroke syndrome in rabbits. In *Experientia*, vol. 48, 1992, p. 225-227.
- LIN, H., DECUYPERE, E., BUYSE, J. 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. In *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 194, 2006, p. 11-17.
- MASHALY, M. M., HENDRICKS, G. L., KALAMA, M. A., GEHAD, A. E., ABBAS, A.O., PATTERSON, P.H. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. In *Poult Sci.*, vol. 83, 2004, no. 6, p. 889-894.
- MEDINA-NAVARRO, R., GUERRERO-LINARES, I. 2009. Whole body hyperthermia reduces oxidative stress in the striatum of rats in an animal model of mitochondrial toxicity with 3-nitropropionic acid. In *Int J Hyperthermia*, 2009 Apr 9:1-9. [Epub ahead of print].
- MINKA, N. S., AYO, J. O. 2008. Haematology and behaviour of pullets transported by road and administered with ascorbic acid during the hot-dry season. In *Research in Veterinary Science*, vol. 85, 2008, p. 389-393.
- NAQVI, S. M. K., GULYANI, R., SINGH, G. 1995. Physiological responses of broiler rabbits in hot semi-arid environment. In *Indian J. Anim. Sci.*, vol. 65, 1995, p. 718-720.
- OKAB, A. B., EL-BANNA, S. G., KORIEEM, A. A. 2008. Influence of environmental temperature on some physiological and biochemical parameters of New-zealand rabbits males. In *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 41, 2008, no. 1, p. 12-19.
- RASOOLI, A., TAHA JALALI, M., NOURI, M., MOHAMMADIAN, B., BARATI, F. 2009. Effects of chronic heat stress on testicular structures, serum testosterone and cortisol concentrations in developing lambs. In *Anim. Reprod. Sci.* 2009 Apr 1. [Epub ahead of print]
- RITCHIE, K. P., KELLER, B. M., SYED, K. M., LEPOCK, J. R. 1994. Hyperthermia (heat shock)-induced protein denaturation in liver, muscle and lens tissue as determined by differential scanning calorimetry. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 10, 1994, no. 5, p. 605-618.
- RORICK-KEHN, L. M., HART, J. C., MCKINZIE, D. L. 2005. Pharmacological characterization of stress-induced hyperthermia in DBA/2 mice using metabotropic and ionotropic glutamate receptor ligands. In *Psychopharmacology*, vol. 183, 2005, no. 2, p. 226-240.
- SAHIN, K., ONDERCI, M., SAHIN, N., GURSU, M. F., VIJAYA, J., KUCUK, O. 2004. Effects of dietary combination of chromium and biotin on egg production, serum metabolites, and egg yolk mineral and cholesterol concentrations in heat-distressed laying quails. In *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 101, 2004, no. 2, p. 181-192.
- SHARMA, H. S., HOOPES, P. J. 2003. Hyperthermia induced pathophysiology of the central nervous system. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 19, 2003, 3, p. 325-354.
- SCHNEIDER, P. L., BEEDE, D. K., WILCOX, C. J. 1988. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. In *J. Anim. Sci.*, vol. 66, 1988, no. 1, p. 112-125.
- SHIH, C. J., LIN, M. T., TSAI, S. H. 1984. Experimental study on the pathogenesis of heat stroke. In *Journal of Neurosurgery*, vol. 60, 1984, p. 1246-1252.

SEVI, A., ANNICCHIARICO, G., ALBENZIO, M., TAIBI, L., MUSCIO, A., DELL'AQUILA, A. 2001. Effects of solar radiation and feeding time on behaviour, immune response and production of lactating ewes under high ambient temperature. In *J. Dairy Sci.*, vol. 84, 2001, p. 629-640.

SKIBBA, J. L., GWARTNEY, E. A. 1997. Liver hyperthermia and oxidative stress: role of iron and aldehyde production. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 13, 1997, no. 2, p. 215-226.

WEST, J. W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. In *Journal of Dairy Science*, vol. 86, 2003, p. 2131-2144.

WEST, J. W., COPPOCK, C. E., MILAM, K. Z., NAVE, D. H., LABORE, J. M., ROWE, L. D. 1987. Potassium carbonate as a potassium source and dietary buffer for lactating Holstein cows during hot weather. In *J. Dairy Sci.*, vol. 70, 1987, no. 2, p. 309-320.

YAN, J., BAO, E., YU, J. 2009. Heat shock protein 60 expression in heart, liver and kidney of broilers exposed to high temperature. In *Research in Veterinary Science*, vol. 86, 2009, p. 533-

### Acknowledgement:

The authors are thankful to Ing. Peter Cupka, Ing. Monika Schneidgenova and Viera Bosel for skillful technical assistance. This work was financially supported by grants APVV 0299-06 and VEGA 1/4347/07.

### Contact address:

Ing. Marcela Capcarová, PhD., Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel: +421 37 641 4343, E-mail: marcela.capcarova@uniag.sk.

## ŤAŽKÉ KOVY – VÝZNAMNÁ ZLOŽKA POTRAVOVÉHO REŤAZCA

## HEAVY METALS – THE IMPORTANT ELEMENT OF THE FOOD CHAIN

*Iveta Cimboláková, Jaroslava Nováková*

### ABSTRACT

Heavy metals are widely found in our environment. Humans and animals are exposed to heavy metals from numerous sources, including contaminated air, water, soil and food. Principal directions of study of heavy metals metabolism are concerned on their absorption, interaction with other elements, molecular mechanisms and events in their pathogenesis, excretion from body, and their residues in environment, foods, feeds, i.e., contamination of food chain. This short review is concerned on these problems.

**Key words:** heavy metal, cadmium, environment, food chain

### ÚVOD

Kontaminácia životného prostredia a jej následky pre živé organizmy sú už dlhšiu dobu v popredí záujmu vedeckej, ale i laickej verejnosti. Na jednej strane určité kovy sú pre normálnu funkciu organizmu potrebné. Obyčajne sú súčasťou enzýmov a plnia rôzne úlohy pri metabolických pochodoch a v prenose elektrónov. Takými to sú Mn, Cu, Co, Fe, Zn, Cr, V, ale vo vyšších koncentráciách môžu byť toxické. Na druhej strane sú kovy schopné bioakumulácie a biomagnifikácie v organizme a pri zvýšených množstvách sa správajú toxicky (**Andreji, Stráňai, 2004**). Medzi najbežnejšie toxické ťažké kovy patria Hg, Cd a Pb. Súčasný stav životného prostredia významne ovplyvňuje genofond rastlín a živočíchov a prostredníctvom potravinového reťazca aj zdravotný stav obyvateľstva a zvierat. Súčasný civilizačný proces je charakterizovaný prudkým rozvojom vedy a techniky. Tento vývoj prináša zvyšovanie životnej úrovne, ale má aj negatívne sprievodné javy. Výsledkom je narušenie ekologických, biologických a prírodných podmienok života dôsledkom emisií najmä v oblastiach priemyselných centier (**Basta, 2006**).

Rozvoj jednotlivých odvetví priemyslu má za následok produkciu kvapalných, plynných a tuhých odpadov, vznik škodlivých faktorov ohrozujúcich zdravie človeka a zvierat, ktoré sa prejavujú zvýšenou bioakumuláciou rizikových chemických prvkov v organizme a sú rizikom aj z hľadiska mutagenézy (**Reichrtová et al. 1989**).

### ŤAŽKÉ KOVY A ŽIVOTNÉ PROSTREDIE

Znečisťujúce látky sa do prostredia dostávajú z rôznych zdrojov a na základe svojich fyzikálno-chemických vlastností sú transportované a zúčastňujú sa biochemických cyklov v jednotlivých zložkách životného prostredia – v ovzduší, vodnom prostredí, pôde, horninách či segmentoch. Vstupujú do potravinového reťazca, prostredníctvom ktorého sa dostávajú do ľudského organizmu, kde dochádza k ich premene buď na neškodné metabolity (detoxikácia), ktoré sa ľahko vylúčia, alebo sa vytvoria škodlivé, reaktívne produkty (obr. 1). Ťažké kovy sú perzistentné úplne, pretože ich atómová štruktúra sa nemení. V prostredí môže dôjsť k nahromadeniu škodlivín. Ťažké kovy predstavujú jednu z najnebezpečnejších skupín škodlivín. Tvoria prirodzenú súčasť zloženia zemského povrchu, a z toho dôvodu sa v rozličných koncentráciách vyskytujú všade (**Kennedy, 2008**). Ich veľkosť v životnom prostredí je daná obsahom, množstvom a pohybom vo všetkých sférach prostredia. Vedľajšie účinky emisií ťažkých kovov sú nebezpečné, lebo sa do prostredia - ovzdušia obyčajne dostanú nekontrolovane.

### ŤAŽKÉ KOVY A POTRAVOVÝ REŤAZEC

V prírode existuje komplexná mnohostranná a zložitá sieť potravinových reťazcov, trofických katén, ktoré tvoria potravinovú sieť, trofický systém, typický pre každý ekosystém. Človek naň potravinovo nadväzuje a má veľký vplyv na jeho výživu, životný štýl a životné prejavy. Všetky typy reťazcov sú navzájom poprepájané, pričom sa funkcia jednotlivých článkov potravinových reťazcov môže meniť, čo spôsobuje, že z organizmu symbiotického sa

stáva dysbiotický, z užitočného škodlivý, patogénny (Zachar, 2008). Zvieratá sú v oveľa širšom rozsahu vystavené vplyvom geochemického prostredia ako človek, a preto zvieratá slúžia ako účinný puffer v nutričnom reťazci, pri redukcii nepriaznivých vplyvov prostredia na konzumenta. Optimalizácia výživy zvierat môže vplývať na potravinový reťazec siahajúci až po človeka (Jesenská et al. 2003). Následkom rôznych stravovacích zvyklostí je u človeka veľmi ťažké posúdiť záťaž (background, pozadie) z ťažkých kovov. Väčšina ťažkých kovov sa do organizmu dostáva rastlinnou alebo živočíšnou potravou, oproti tomu je záťaž z ovzdušia, resp. pitnej vody podstatne nižšia. Vo väčšine krajín sú v platnej legislatíve zakotvené NPM (najvyššie prípustné množstvá) pre jednotlivé ťažké kovy vo vode, ovzduší a potravinách rastlinného resp. živočíšneho pôvodu (najmä konzervovaných potravinách, kde sa do obsahu môžu ťažké kovy dostať z obalových materiálov). Preto z hľadiska zabezpečenia zdravia ľudskej populácie sa za dôležité považuje ochrana potravinového reťazca aj pred kontamináciou ťažkými kovmi. To si vynútilo zvýšený záujem o kontrolu bezpečnosti potravín z obsahu toxických, ale aj rizikových kovov. Bezpečnosť potravín predstavuje súbor opatrení, a to hlavne na úseku ochrany zdravia a pohody zvierat a úseku potravín a krmív (Sinclair et al. 2008). Ich realizáciou sa dosiahne bezpečnosť všetkých zložiek potravinového reťazca. Výskyt cudzorodých látok v zložkách životného prostredia a v produktoch poľnohospodárskej a potravinovej výroby sa

sleduje prostredníctvom náhodnej kontroly a pravidelným monitoringom (Ganga, Hettiarachchi, 2006).

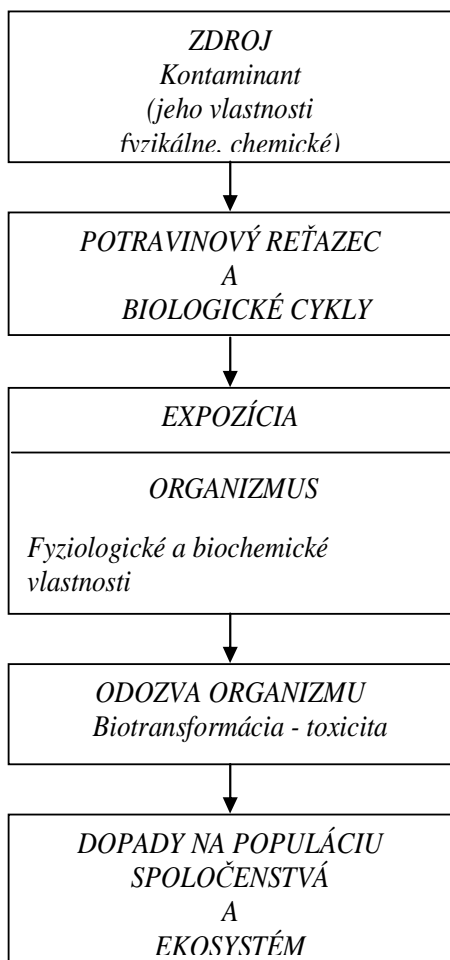
### MECHANIZMUS ÚČINKU ŤAŽKÝCH KOVŮV

Pre toxický účinok kovov je dôležitá tendencia iónov kovov vytvárať komplexy s bielkovinami, pričom reagujú prevažne s SH-skupinami. Tak môžu zlúčeniny kovov už v nízkych koncentráciách inhibovať enzýmy, ktoré obsahujú funkčne dôležité SH-skupiny.

Príznaky: Toxicita ťažkých kovov sa prejavuje predovšetkým na malých cievach. Tieto poškodené cievy sú príčinou typických príznakov otravy ťažkými kovmi. Poškodené môžu byť orgány – pečeň, obličky. Dôležité je, že sa v týchto orgánoch a tiež v čreve kovy silne koncentrujú. Zaujímavá je tendencia ťažkých kovov ukladať sa do „depozitu“, kedy sa po prerušení ich prívodu uvoľňujú celé mesiace. Vráťane aj tých, ktoré organizmus potrebuje ako stopové prvky – viažu sa na špeciálne nízkomolekulové bielkovinové štruktúry – tzv. metalothioneiny (Lullmann, Mohr, Wehling, 2004).

### NIEKTORÉ POZNATKY ŠTÚDIÍ O TOXICITE KADMIA – Cd

Kadmium patrí medzi toxické prvky, ktorým sa venuje veľká pozornosť pre ich toxicitu a ubikvitentnosť a trvalo znečisťuje životné prostredie. Pôsobí na mnohé orgánové systémy a jeho toxický účinok môže ovplyvniť biochemické systémy vzhľadom k jeho chemickým vlastnostiam. Lahko reaguje s biologicky aktívnymi molekulami vrátane proteínov, fosfolipidov, purínov, nukleových kyselín a enzýmov. Do organizmu sa dostáva hlavne inhalačnou a alimentárnou cestou. Okrem toho môže za určitých podmienok prechádzať i transplacentárne z krvi matky do plodu a vo veľmi nízkom rozsahu aj hematoencefalickou bariérou. Absorbcia kadmia kožou je veľmi nízka. Inhalačná absorbcia je závislá na veľkosti a rozpustnosti vdychovaných častíc. Zdrojom inhalovaného kadmia nemusia byť iba priemyselné zdroje, spaľovanie uhlia, ale aj inhalačná expozícia cigaretového dymu. (Friberg, Kjellstrom, Nordberg, 1986). U ľudí sa denný príjem Cd pohybuje na úrovni 50 µg. V povrchových a pitných vodách sa koncentrácia Cd pohybuje od 1 µg po 10 µg. Konečný obsah vo vodách však neprekračuje spravidla hodnotu 0,01 mg.l<sup>-1</sup> v dôsledku sorpcie tohto kovu na sedimentoch. Toxický efekt kadmia sa prejaví vtedy, keď ióny kadmia zasiahnu v dostatočne efektívnej koncentrácii príslušné receptné miesto v organizme. Tento proces je ovplyvňovaný vstrebávaním, kumuláciou, metabolizmom a vylučovaním. Ak dosiahne koncentrácia určitú kritickú hodnotu, začnú sa prejavovať niektoré reverzibilné a ireverzibilné zmeny bunkových funkcií. Pre kadmium sú kritickými orgánmi semenníky, pľúca, obličky a pečeň (Horiguchi, 2007). Pri krátkodobej expozícii s vysokými koncentraciami v ovzduší sú kritickým orgánom pľúca, pri dlhodobej expozícii nízkymi koncentraciami pri rovnakej bráne vstupu sú ním obličky. Jedným z najdôležitejších orgánov pre vstup kadmia do organizmu sú pľúca, v ktorých sa uskutočňuje priamy kontakt medzi vnútorným a vonkajším prostredím.



Obrázok 1 Účinok toxických látok v biosfére

Výraznú úlohu z hľadiska retencie kadmia v organizme predstavuje pečeň (Blazovicz et al. 2002).

Toxické kovy vrátane kadmia zapríčínajú zvýšenú produkciu bioreaktívnych foriem kyslíka, ktoré následne indukujú oxidačný stres v bunkách. Je to následok toxického účinku týchto kovov, a tiež vyčerpania antioxidantov v organizme (Lovasová et al. 2002). Pôsobenie kadmia nemožno lokalizovať na jedno miesto – orgán, ale je pluripotentné. Ťažké kovy tvoria jednu z najnebezpečnejších skupín biologicky významných škodlivín a ich výskyt je v Slovenskej republike pravidelne monitorovaný. Neschopnosť degradovať sa s prírodnými procesmi pôsobením minerálnych a biologických pochodov spôsobuje, že sa tieto kovy hromadia (geo-bio-ekokumulácia). Priamo alebo cez potravné reťazce potom môžu spôsobovať akútne alebo chronické intoxikácie (Massányi et al. 1995). Účinok ťažkých kovov sa prejaví obyčajne po dlhodobej expozícii, vyvolávajú chronické intoxikácie (Massanyi et al. 2004, Nad' et al., 2007) vrátane porúch reprodukcie a postihnutia reprodukčných funkcií (Paksy, Varga, Lazar, 1996, Lukáč et al. 2007). Problematika štúdia intoxikácie ťažkými kovmi je nesmierne zložitá a aktuálny problém. Vplyv ťažkých kovov na rôzne fyziologické a biochemické parametre je v odbornej literatúre vcelku podrobne analyzovaný pre akútne intoxikácie. Chronická intoxikácia môže viesť k závažnému poškodeniu zdravia a následným ekonomickým a spoločenským konzekvenciám.

### ZÁVER

Ťažké kovy predstavujú pre človeka vážne riziko bez ohľadu na zdroj, z ktorého sa do jeho organizmu dostávajú. Zdravé životné prostredie musí podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) spĺňať päť základných podmienok: čisté ovzdušie, bezpečná pitná voda a jej dostatok, bezpečné a vyživovo-hodnotné potraviny, bezpečné a mierové obydľia a obce, stabilné globálne ekosystémy vhodné pre život ľudí. Kontrola kvality potravín v SR patrí medzi základné úlohy potravinového dozoru aj s účasťou štátneho zdravotného dozoru. Limity cudzorodých látok v potravinových komoditách SR sú harmonizované s limitmi EÚ.

### LITERATÚRA

ANDREJI, J., STRÁŇAI, J., 2004. Obsah chrómu, olova, kadmia a ortuti vo svalovine rýb v závislosti na dĺžke tela a hmotnosti. In *Rizikové faktory potravného reťazca IV*, Nitra, 2004, s. 12-14.

BASTA, N. T., 2006. Heavy metal contamination of soil problems and remedies. In *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, roč. 70, 2006, s. 18-19.

BLAZOVICZ, A., ABAZA, M., SIPOS, P., SZENTMIHALYI, K., FEHER, E., SZILAGYI, M., 2002. Biochemical and morphological changes in liver and gallbladder bile of broiler chicken exposed to heavy metals (cadmium, lead, mercury). In *Trace Elements and Electrolytes*, roč. 19, 2002, č.1, s. 42-47.

FRIBERG, L., KJELLSTROM, T., NORDBERG, G. F., 1986. Cadmium In: Friberg L., Nordberg, G.F., Vouk V.B. (Eds.) *Handbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier Amsterdam, 1986, s. 130 - 184.

GANGA, M., HETTIARACHCHI, I., 2006. Ecosystems bioavailability, toxicity, and risk relationships. In *Environ. Qual.*, roč. 35, 2006, s. 951 - 952.

HORIGUCHI, H., 2007: Anemia induced by cadmium intoxication, In *Nippon Eiseigaku Zasshi.*, roč. 62, 2007, č. 3, s. 884 -904.

JESENSKÁ, M., HIŠČÁKOVÁ, M., NOVOTNÝ, J., LINK, R., KOVÁČ, G., 2003. Koncentrácia olova v krvnom sére, mlieku a moči dojnic. In *Rizikové faktory potravného reťazca III*. Nitra, 2003, s. 51-52.

KENNEDY, S., 2008. EPIDEMIOLOGY: Why can't we test our way to absolute food safety? In *Science*, roč. 322, 2008, s. 1641 - 1643.

LOVASOVÁ, E., ŠIPULOVÁ, A., NIŠTIAR, F., RÁCZ, O., 2002. The effect of chronic cadmium and mercury exposure on the plasma total antioxidant status in rats. In *Folia Veterinaria*, roč. 46, 2002, č. 2, s. 61-64.

LUKÁČ, N., MASSÁNYI, P., ZAKRZEWSKI, M., TOMAN R., CIGÁNKOVÁ V., STAWARZ R., 2007. Cobalt induced alterations in hamster testes in vivo. In *J. Environ. Sci. Health A*, roč. 42, 2007, s. 389-392.

LULLMAN, H., MOHR, K., WEHLING, M., 2004. *Farmakologie a toxikologie*. ISBN 80-2470836-1. Praha: Grada Publishing a.s., 2004, 728 s.

MASSÁNYI, P., TOMAN, R., UHRÍN, V., RENON, P., 2004. Distribution of cadmium in selected organs of rabbits after an acute and chronic administration. In *Ital. J. Food Sci.*, roč. 3, 2004, s. 211-316.

MASSÁNYI, P., TOMAN, R., VALENT, M., ČUPKA, P., 1995. Evaluation of selected parameters of a metabolic profile and levels of cadmium in reproductive organs of rabbits after an experimental administration. In *Acta Physiol. Hung.*, roč. 83, 1995, s. 267-273.

NAĎ, P., MASSÁNY, P., SKALICKÁ, M., KORÉNEKOVÁ, B., CIGÁNKOVÁ, V., ALMÁŠIOVÁ, V., 2007. The effect of cadmium in combination with zinc and selenium on ovaria structure in Japanese quails. In *J. Environ. Sci. Health A*, roč.42, 2007, s. 2017-2022.

PAKSY, K., VARGA, B., LAZAR, P., 1996. Effect of cadmium on female fertility, pregnancy and postnatal development in the rat. In *Acta Physiol. Hung.*, roč. 84, 1996, s. 196-130.

REICHRTOVÁ, E., TAKÁČ, Ľ., KOVÁČIKOVÁ, Z., FOLTÍŇOVÁ, J., BENCKO, V., KRENEROVÁ, J., 1989. Bioaccumulation of metals from nickel smelter waste in P and F generations of exposed animals. I. Dynamic of metal distribution in the organs and AM activity. In *J. Hyg. Epidem.*, roč. 33, 1989, s.1 - 10.

SINCLAIR, R., BOONE, S. A., GREENBERG D., KEIM P., GERBA CH. P., 2008. Persistence of Category A Select Agents in the Environment. In *Appl. Envir. Microbiol.*, roč. 74, 2008, s. 555 - 563.

ZACHAR, D., 2008. *Výživa človeka I*. TU Zvolen, 2008, 328 s. ISBN 978-80-228-1869-8.

### Kontaktná adresa:

Ing. Iveta Cimboláková, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav patologickej fyziológie, Tr. SNP č.1, Košice, Tel.: 055/6404478, E-mail: iveta.cimbolakova@upjs.sk

## OPTIMALIZOVANIE HPLC SEPARÁCIE 15+1 EÚ PRIORITNÝCH PAU OPTIMALIZATION HPLC SEPARATION 15+1 EU PRIORITY PAH<sup>S</sup>

Róbert Germuška, Jozef Golian

### ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are compounds with a carcinogenic potential. They are formed mainly by an incomplete combustion of wood and coal. Benzo(a)pyrene (BaP) is an indicator of any PAHs contamination of foodstuffs, however, it was proved dubious because other PAHs are also dangerous for human beings and their monitoring is needed. European Food Safety Authority (EFSA) therefore recommended analyzing also other PAHs in foodstuffs, so called 15+1 EU priority PAHs. Comprehensive separation of 15+1 EU priority PAHs with total separation time under 10 minutes using HPLC is not solved at the present time and further investigation is needed.

In terms of the specified purposes we have tuned a HPLC chromatography separation of 15+1 EU priority PAHs within 31 minutes. Critical pair pyrene and benzo(c)fluorene were not separated under our chromatography conditions. Using a specific detection conditions solved this separation.

**Keywords:** benzo(a)pyrene, polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs, HPLC

### ÚVOD

Polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU) sú potenciálne karcinogénne látky. Vznikajú najmä nedokonalým spaľovaním dreva a uhlia. Práve údenie, ako spôsob konzervácie potravín, je jedným zo zdrojov kontaminácie PAU v potravinách a pri nedodržaní správneho údiaceho procesu nastáva väčšie formovanie PAU. Benzo(a)pyrén (BaP) je indikátorom kontaminácie potravín PAU. Ukazuje sa, že aj iné PAU sú nebezpečné a ich monitorovanie v potravinách je potrebné. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA), preto odporučil monitorovať aj ďalšie PAU v potravinách, tzv. 15+1 EÚ prioritné PAU.

Uvedenie Ames testu v roku 1975 (Ames et al., 1975) poskytlo rýchlu metódu izolácie potenciálnych karcinogénov v potravinách na základe ich mutagénnej aktivity.

Polycyklické aromatické uhľovodíky vznikajú nedokonalým spaľovaním fosilných palív a ropných produktov. Sú široko distribuované do celého životného prostredia, a preto sa človek expozícii nemôže vyhnúť. Veľký počet z nich, takých ako benzo(a)pyrén, majú karcinogénne a mutagénne účinky a sú považované za najhlavnejší príspevok vzniku všetkých typov nádorov populácie (Smith et al., 2001). V roku 2002 Vedecký výbor pre potraviny (SCF) prehodnotil toxicitu PAU (SCF, 2002). Záverom tohto skúmania bolo, že 15 látok zo skupiny PAU sú evidentne toxické. Výbor odporučil, aby hodnota PAU v potravinách bola zredukovaná tak nízko ako je to len možné. V roku 2005 spoločný FAO/WHO expertný výbor pre potravinárske aditíva (JECFA) predstavil odhad rizika PAU a zhodol sa so závermi SCF. Zároveň k 15 látkam zo skupiny PAU pridal benzo(c)fluorén a vypracoval zoznam prioritných tzv. 15+1 PAU, ktorým by sa mala venovať zvýšená pozornosť (JECFA, 2005).

Prípady kontaminácie potravín PAU poukazujú na to, že viac než jedna polovica všetkých polycyklických aromatických uhľovodíkov pripadá na nekarcinogénne alebo veľmi slabo karcinogénne typy PAU ako sú pyrén a fluorantén. Môžeme polemizovať, či stačí merať úroveň kontaminácie potravín PAU iba cez benzo(a)pyrén. V niektorých prípadoch nám o zdroji kontaminácie polycyklických aromatických uhľovodíkov v potravinách môžu viac poskytnúť merania aj iných PAU. Takto boli

objavené rôzne zdroje znečistenia PAU rýb a ulitníkov v Japonskom mori. V rôznych druhoch rýb sa našli rôzne pomery jednotlivých polycyklických aromatických uhľovodíkov, čo viedlo k nájdeniu zdroja kontaminácie (Takatsuki et al., 1985; Nobuyoshi et al., 2000).

Detailnými analýzami obsahu PAU v údených potravinách a to konkrétne v údenom mäse a rybách sa venovali Goma et al. (1993). V údenom mäse nachádzali obsahy PAU v koncentračnom rozmedzí 2,6 – 29,8  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . V údených rybách 9,3 – 86,6  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Koncentrácia benzo(a)pyrénu, benzo(a)antracénu, benzo(b)fluoranténu, dibenz(a,h)antracénu a indeno(1,2,3-c,d)pyrénu v lososovi dosahovala hodnotu 16,0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Polycyklické aromatické uhľovodíky boli tiež nájdené v údenom kvapalnom dyme v celkovom množstve do 43,7  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a z toho do 10,2  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  v piatich hore uvedených karcinogénnych PAU.

Monitorovanie expozície človeka karcinogénnymi látkami v poslednej dobe naberá na obrátkach a venuje sa jej mnoho vedcov (Scherer et al., 2000; Kubiak et al., 1999; Marafie et al., 2000).

Európska Komisia si v roku 2002 nechala vypracovať Vedeckým výborom pre potraviny (SCF) detailnú správu o riziku polycyklických aromatických uhľovodíkov pre zdravie ľudí. Správa veľmi detailne identifikuje rizikové faktory PAU, definuje riziká a odhaduje expozíciu (European Commission, 2002).

Podľa všetkých týchto štúdií je zrejmé, že monitorovanie kontaminácie PAU v prostredí a potravinách je potrebné. Tak napríklad Germuška (2002) vo svojom experimente zisťoval úroveň kontaminácie benzo(a)pyrénom v údených syrových korbáčikoch a navrhuje spôsob ako redukovat túto kontamináciu na čo najnižšiu hladinu. Podľa výsledkov z EFSA (2007) aj káva bola pomerne často kontaminovaná benzo(a)pyrénom, kde až 5,9 % výrobkov prekračovalo hladinu 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Maximálny limit pre túto komoditu neexistuje.

V Slovenskej republike Potravínový kódex SR (1996) ustanovil maximálne prípustné množstvá benzo(a)pyrénu v jednotlivých komoditách. V odseku II. uvádza, že referenčnou látkou je benzo(a)pyrén, ktorý mal ako jediný udávané najvyššie prípustné množstvo nasledovne:

- 0,001  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ - údené mäsové a rybacie výrobky
- 0,003  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ - korenené a paprikové klobásky a salámy
- 0,005  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ - rastlinné oleje
- 0,01  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ - ostatné potraviny rastlinného pôvodu.

Vstupom Slovenskej republiky do EÚ boli prevzaté spoločné nariadenia a smernice, upravujúce maximálne prípustné množstvá PAU v potravinách. Na tomto mieste treba pripomenúť, že Slovenská republika mala PAU regulované vo svojej legislatíve ešte predtým ako existovala spoločná EÚ regulácia. Až **Nariadenie Komisie (ES) 208/2005 z 4. februára 2005** ako novela **Nariadenia Komisie (ES) 466/2001** ustanovovalo najvyššie prípustné množstvá PAU v potravinách. Ako indikátor PAU bol zvolený benzo(a)pyrén. **Nariadenie Komisie (ES) 1881/2006 zrušilo Nariadenie Komisie (ES) 466/2001** aj so všetkými jeho novelami. V časti venovanej maximálnym prípustným množstvám PAU nenastala však žiadna zmena. Treba pripomenúť, že pôvodné limity benzo(a)pyrénu v našej legislatíve boli oveľa prísnejšie ako európske. Tak napríklad mäsové výrobky môžu obsahovať najviac  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , čo je 5 krát viac ako v našej pôvodnej národnej legislatíve. **Nariadenie Komisie (ES) 333/2007 z 28. marca 2007**, ktoré nahrádza Smernicu **Komisie 2005/10/ES**, popisuje kritériá na odber vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu úrovni obsahu benzo(a)pyrénu v potravinách. **Odporúčanie Komisie 2005/108/ES** odporúča jednotlivým členským krajinám vykonávať monitoring rezíduí aj iných PAU ako benzo(a)pyrén tzv. 15+1 EÚ prioritných PAU v potravinách, pre účely zistenia úrovne kontaminácie touto širšou plejádou organických polutantov. V tabuľke 3 je uvedený zoznam týchto kontaminantov. Stály výbor potravinového reťazca a zdravia zvierat pri Európskej Komisii zozbieral dňa 12.12.2008 na vedomie, že na základe doterajších zistení nie je benzo(a)pyrén dostatočným indikátorom kontaminácie PAU v potravinách a následne sa uzgodilo, že benzo(a)pyrén, chryzén, benzo(a)antracén a benzo(b)fluorantén sú viac vhodné ako indikátory kontaminácie. Podkladom k týmto zisteniam bola správa Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA) vypracovaná v roku 2007. Na základe Odporúčania Komisie 2005/108/ES boli zbierané údaje o úrovni kontaminácie PAU v potravinách z jednotlivých členských krajín únie. Z 18 zúčastnených krajín boli zozbierané údaje zo 7786 vzoriek. Z výsledkov vyplýva, že len benzo(a)pyrén nie je dostačujúci ako marker kontaminácie PAU, ale najmenej 3 ďalšie PAU je potrebné v budúcnosti sledovať ako markery a ustanoviť pre ne taktiež najvyššie prípustné množstvá (EFSA, 2007). Z uvedeného vyplýva potreba zaviesť a praktizovať analytickú metódu stanovenia rezíduí všetkých 15+1 EÚ prioritných PAU v potravinách a zistiť analyzovaním v reálnych vzorkách z tuzemskej výroby úroveň kontaminácie aj iných PAU ako iba benzo(a)pyrénu. Takže hlavným zdôvodnením práce je, že v blízkej budúcnosti budú zrejme ustanovené maximálne limity aj pre iné PAU v potravinách, a preto je potrebné mať k dispozícii vhodnú analytickú metódu stanovenia.

**Norma STN EN ISO 15753 z roku 2006** uvádza analytickú metódu stanovenia rezíduí 15 PAU v rastlinných tukoch a olejoch, ale nezahŕňa analýzy všetkých 15+1 EÚ prioritných PAU. Analýza sa realizuje pomocou kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou (HPLC/FLD). Simon et al., (2006) uvádza analytickú metódu stanovenia 15+1 EÚ prioritných PAU v kvapalnom dyme. Autor sa venuje optimalizácii chromatografickej separácie ťažších PAU za použitia

plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou. Momentálne neexistuje úplne optimálna metóda separácie PAU s dobrou detegovateľnosťou na všetky EÚ prioritné PAU. Treba ešte spomenúť on-line DACC-HPLC-FLD analytickú techniku. Ide o simultánne prečistenie extraktu pomocou donor akceptor komplexnej chromatografie a následnej separácie PAU na analytickej kolóne s fluorescenčnou detekciou.

V ostatnom období sú pokusy zavádzať iné extrakčné techniky na extrakciu rezíduí, ktoré by zredukovali čas extrakcie a použili menšie množstvo rozpúšťadiel. Taká je napríklad „superkritická fluidná extrakcia (SFE)“, ktorá je založená na extrakcii tuhých matric v tlakovej extrakčnej cele s kvapalným oxidom uhličitým za vyššieho tlaku a teploty v oblasti nadkritických podmienok, t.j. takých, kde už nemôže pri prekročení kritickej teploty existovať  $\text{CO}_2$  v kvapalnom stave. Práve tieto tzv. superkritické podmienky majú veľmi dobrú vlastnosť pre extrakciu. Vypracovanie extrakčnej metódy je však dosť zložitá z dôvodu rôznorodosti matric a nemožnosti dosť dobrej unifikácie extrakčného postupu pre širšiu škálu komodít. (Reimer et al., 1995; Xianwen et al., 1996; Yao, 1996; Fuoco et al., 1997; Hsieh et al., 1997; Becnel et al., 1998; Lutermann et al., 1998; Berg et al., 1999; Bayona, 2000; Hawthorne et al., 2000; Wong et al., 2001; Rudzinski et al., 2000; Salleh et al., 2000; Luque de Castro et al., 2000; McDaniel et al., 2001).

Ako ďalšiu techniku môžeme spomenúť tzv. mikrovlnnú extrakciu (MAE) (Lopez et al., 1996; Eskilsson et al., 2000; Shu et al., 2000; Camel, 2000), ktorá je založená na pôsobení mikrovlnného žiarenia na vzorku zaliatu rozpúšťadlom. V tomto prípade je množstvo extrahovanej vzorky pomerne nízke (cca 1 g) a množstvo použitého extrakčného činidla nie je príliš malé. Šírenie mikrovln v organických rozpúšťadlách nie je dokonalé kvôli malému dielektriku týchto kvapalín. Táto metóda extrakcie nemá preto taký význam ako mikrovlnná mineralizácia v prípade stanovenia ťažkých kovov v živočíšnych matriciach, ale predsa sa pomerne často využíva.

### MATERIÁL A METODIKA

V práci sme optimalizovali HPLC separáciu 15+1 prioritných PAU.

K vykonaniu experimentu sú potrebné základné kalibračné roztoky 15+1 EÚ prioritných PAU o pomerne vysokej koncentrácii každého PAU cca 1 až  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Všetkých 15+1 EÚ prioritných PAU bude detegovaných na detektore s diódovým poľom (DAD) pri vlnovej dĺžke 254 nm. Pri tejto vlnovej dĺžke sú detegovateľné všetky PAU, ale s pomerne malou citlivosťou. Podstatné je, aby sme mohli celkovo nešpecificky detegovať v chromatografickom behu všetky eluujúce látky. Pri tomto experimente nie je podstatná citlivosť, ale dosiahnutie čo najlepšej separácie jednotlivých pík. Experiment sa prevedie na chromatografických kolónach Waters PAH C18; 4,6x250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; SUPECOSIL LC-PAH; 4,6x250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Merck Chromolith Performance RP-18e, 100x4,6 mm; Agilent Eclipse PAH, 4,6x 50 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ . Tá kolóna, na ktorej sa dosiahne najkratší celkový čas separácie všetkých 15+1 EÚ prioritných PAU bude ďalej použitá pri ďalších experimentoch. Pri optimalizácii separácie sa budú hľadať také podmienky gradientovej elúcie, aby boli



odseparované od seba kritické páry benzo(c)fluorén a pyrén, benzo(j)fluorantén a benzo(b)fluorantén a zároveň sa dosiahol čo najkratší čas elúcie dibenzo(a,i)pyrénu a dibenzo(a,h)pyrénu, ktoré majú najväčšiu retenciu na separačných kolónach. Taktiež by mal byť celkom odseparovaný od ostatných PAU benzo(b)chryzén, ktorý sa použije ako vnútorný štandard.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Separáciu 15+1 EÚ prioritných PAU sme testovali na štyroch druhoch chromatografických kolón od rôznych výrobcov v režime obrátených fáz za využitia gradientovej elúcie. Experiment sme previedli na chromatografických kolónach Waters PAH C18; 4,6x250 mm, 5 µm; SUPECOSIL LC-PAH; 4,6x250 mm, 5 µm; Merck Chromolith Performance RP-18e, 100x4,6 mm; Agilent Eclipse PAH, 4,6x 50 mm, 1,8 µm. Postupne sme na tieto chromatografické kolóny nastrekli zmes individuálnych PAU o koncentrácii 1- 10 mg.l<sup>-1</sup>. Všetkých 15+1 EÚ prioritných PAU sme detegovali na detektore s diódovým poľom (DAD) pri vlnovej dĺžke 254 nm. Pri tejto vlnovej dĺžke sú detegovateľné všetky PAU, ale s pomerne malou citlivosťou. Podstatné je, aby sme mohli nešpecificky detegovať všetky eluujúce látky z chromatografickej kolóny. V jednotlivých meraniach sme menili podmienky gradientovej elúcie t.j. zloženie mobilnej fázy v čase až dovtedy, kým sme zistili najlepšiu separáciu. Na elúciu PAU sme použili zmes acetonitrilu s vodou. Pri chromatografii na obrátených fázach má acetonitril vyššiu elučnú silu ako voda. So zvyšujúcou koncentráciou acetonitrilu v mobilnej fáze sú z chromatografickej kolóny vypudzované látky, ktoré majú vyššiu retenciu na kolóne. Pri optimalizovaní separácie PAU sme kládli dôraz na úplné odseparovanie kritických párov benzo(c)fluorénu a pyrénu, benzo(j)fluoranténu, benzo(b)fluoranténu a benzo(k)fluoranténu. Ani na jednej z týchto chromatografických kolón sa nám nepodarilo odseparovať pyrén od benzo(c)fluorénu. Taktiež sme vyriešili skrátenie retenčného času veľmi ťažkých PAU dibenzo(a,i)pyrénu (DiP) a dibenzo(a,h)pyrénu (DhP). Tieto PAU majú mimoriadnu retenciu na kolóne. Urýchleniu elúcie týchto PAU sme napomohli zvýšením prietoku mobilnej fázy z 1,5 ml.min<sup>-1</sup>, ihneď po eluovaní benzo(b)chryzénu, až na 2,5 ml.min<sup>-1</sup>. Keďže prakticky v tejto fáze gradientovej elúcie je pumpovaný cez chromatografickú kolónu iba acetonitril, ktorý má vysokú elučnú silu, nepozorovali sme výrazné zvýšenie vstupného tlaku na chromatografickej kolóne. Pri opakovaných nástrekoch kalibračných roztokov a pri rovnakých podmienkach separácie sme nepozorovali drift (posun) retenčných časov u týchto veľmi ťažkých PAU (DiP, DhP). V prípade chromatografickej kolóny SUPECOSIL LC-PAH; 4,6x250 mm, 5 µm sa nám nepodarilo skrátiť čas separácie pod 50 minút. V prípade chromatografickej kolóny Waters PAH C18; 4,6x250 mm, 5 µm sme celkový čas chromatografickej separácie skrátili až na 31 minút, čo je dobrý kompromis. Obrázok 1 ukazuje optimalizovanú separáciu všetkých 15+1 EÚ prioritných PAU štandardného roztoku s koncentraciami jednotlivých PAU 5-50 µg.l<sup>-1</sup> na chromatografickej kolóne Waters PAH C18; 4,6x250 mm, 5 µm. Odborná literatúra popisuje zrýchlené separácie PAU na tzv. monolitických kolónach alebo rapid resolution kolónach, kde separácia PAU

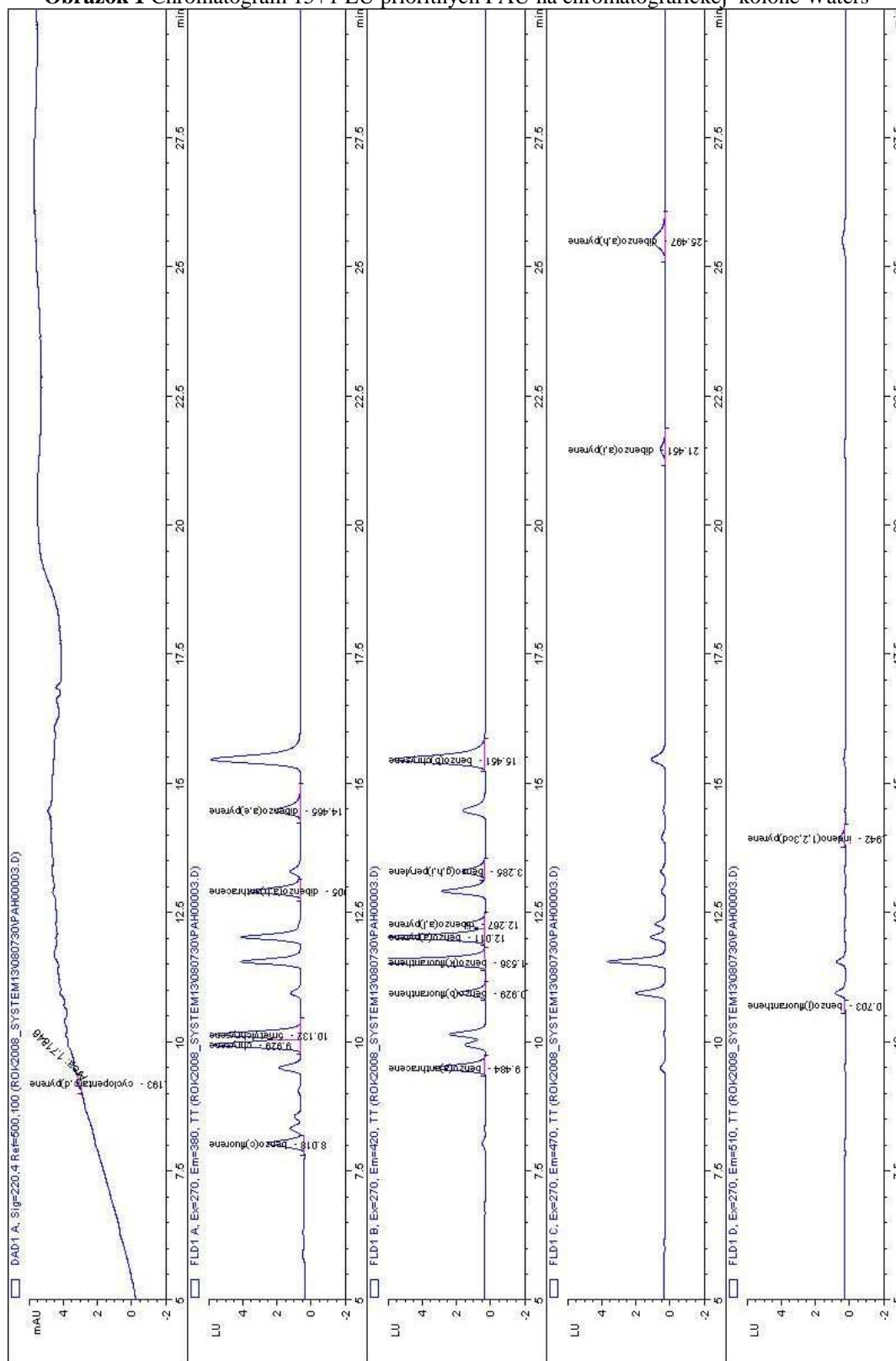
prebieha veľmi rýchlo a prakticky 16 EPA PAU sú kompletne vyeluované do 10 minút. **Hollosi (2009)** sa svojej práci zaoberá úplnou HPLC separáciou 15+1 EÚ prioritných PAU na chromatografických kolónach so štandardnou veľkosťou častíc (5 µm) a malými časticami (3 µm a 1,8 µm). Taktiež sa zaoberá separáciou PAU na monolitických kolónach. Pokiaľ majú byť látky úplne odseparované, musí byť rozdeľovací koeficient  $R_s > 1,5$ . Všeobecne trendom je skracovanie času separácie. Urýchliť elúciu možno zvýšením teploty chromatografickej kolóny, alebo zvýšením prietoku mobilnej fázy (monolitické chromatografické kolóny) alebo zmenšením veľkostí častíc. Tu ale dochádza k veľkému nárastu tlaku a to vyžaduje použitie kvapalinové pumpy, ktoré dokážu vyvinúť tlak aspoň 600 barov. Na chromatografických kolónach s veľkosťou častíc 5 µm dosiahol autor podobnú separáciu 15+1 EÚ prioritných PAU pričom celkový čas analýzy bol 24 minút. Vyššie spomínaný autor ďalej vykonával pokusy so skrátením separácie použitím kolón s časticami 3 µm. Celkový čas separácie bol 10 minút, ale rozdeľovací faktor  $R_s > 1,5$  nebol dosiahnutý medzi chryzénom a 5 metylchryzénom a aj medzi chryzénom a benzo(a)antracénom alebo benzo(j)fluoranténom a benzo(b)fluoranténom. DhA a BgP neboli taktiež dostatočne odseparované. Autor testoval vplyv teploty a efekt prietoku mobilnej fázy na separáciu PAU, pričom pri teplote 45 °C a prietoku mobilnej fázy 2 ml.min<sup>-1</sup> dosiahol najlepšiu separáciu s celkovým časom 4 minúty, ale DhA a IcP neboli dostatočne odseparované. V prípade použitia chromatografických kolón s veľkosťou častíc pod 2 µm celkový čas separácie bol 8 minút, ale bola pozorovaná silná retencia DiPa DhP t.j. veľmi ťažkých PAU, a nedostatočná separácia chryzénu od 5 metylchryzénu. Na optimalizovanie separácie by bolo potrebné miešať až tri mobilné fázy, ale k dispozícii sú len kvapalinové pumpy pre vysokotlakovú gradientovú elúciu umožňujúce miešať iba dve rozpúšťadlá. Skrátiť čas separácie všetkých 15+1 EÚ prioritných PAU vyžaduje ešte ďalšie testovanie.

V našej práci sme podobne ako **Hollosi (2009)** testovali aj iné druhy chromatografických HPLC kolón (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100x4,6 mm; Agilent Eclipse PAH, 4,6x 50 mm, 1,8 µm.) s cieľom úplnej separácie 15+1 EÚ prioritných PAU v čase do 10 minút. Nepodarilo sa nám vôbec dosiahnuť zrýchlenie elúcie veľmi ťažkých PAU dibenzo(a,i)pyrénu a dibenzo(a,h)pyrénu. Tieto kolóny taktiež neseparovali kritické páry benzo(j)fluorantén od benzo(b)fluoranténu a chryzén od 5metylchryzénu. Tieto kolóny skôr môžu byť použité pre separácie 16 EPA PAU, kde je potrebné separovať ľahšie PAU ako napríklad antracén, fenantrén.

### ZÁVER

Keďže benzo(a)pyrén ako indikátor kontaminácie potravín PAU podľa Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA) nie je dostatočujúci, mala by sa venovať zvýšená pozornosť aj iným PAU. Je na mieste disponovať robustnou a spoľahlivou analytickou metódou stanovenia rezíduí aj iných PAU ako iba benzo(a)pyrénu. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA) indikoval 15+1 EÚ prioritných PAU, ktoré by bolo potrebné monitorovať v potravinách. Tieto PAU nie sú identické s 16 EPA PAU, ktoré indikoval Americký úrad pre ochranu životného

Obrázok 1 Chromatogram 15+1 EÚ prioritných PAU na chromatografickej kolóne Waters



prostredia (EPA). Preto na odlíšenie sa používa pojem 15+1 EÚ prioritných PAU. Niektoré z týchto PAU nie je ľahké separovať ani detegovať. Sú možné prakticky dva postupy. Buď použiť plynovú chromatografiu s hmotnostnou detekciou alebo kvapalinovú chromatografiu s fluorescenčnou a UV detekciou. Ani jedna z týchto techník nie je optimálna. V práci sme testovali separáciu PAU na 4 rôznych druhoch HPLC chromatografických

kolón a skrátli sme dĺžku analýzy veľmi ťažkých PAU dibenzo(a,i)pyrénu a dibenzo(a,h)pyrénu. Úplná separácia 15+1 EÚ prioritných PAU pomocou HPLC s celkovým separačným časom do 10 minút nie je v súčasnej dobe doriešená a vyžaduje ďalšiu optimalizáciu. Pri skracovaní separačného času je nedostatočne odseparovaný chryzén od 5 metylchryzénu a taktiež benzofluorantény. Najkratší nami dosiahnutý čas separácie bol 31 minút.

LITERATÚRA

- AMES, B. N., MCCANN, J., YAMASAKI, E. 1975. Carcinogenic of benzo(a)pyrene. In: *Mutation Res.*, 1975, 31, p. 347-356.
- BAYONA, J. M. 2000. Supercritical fluid extraction in speciation studies. In: *Analytical Chemistry*, 19, 2000, 2-3, p. 107-112.
- BECNEL, J. M., DOOLEY, K. M. 1998. Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures from contaminated soils. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 37, 1998, 2, p. 584-594.
- BERG, B. E., LUND, H. S., KRINGSTAD, A., KVERNHEIM, A. L. 1999. Routine analysis of hydrocarbons, PCB and PAH in marine sediments using supercritical CO<sub>2</sub> extraction. In: *Chemosphere*, 38, 1999, 3, p. 587-599.
- CAMEL, V. 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. In: *Analytical Chemistry*, 19, 2000, 4, p. 229-248.
- European Commission, Health and Consumer protection directorate – general, Scientific Committee on Food, 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final, 2002
- European Food Safety Authority, 2007. Finding of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, EFSA/DATEX/002, 2007
- ESKILSSON, C. S., BJÖRKLUND, E. 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. In: *Journal of Chromatography A*, 902, 2000, 1, p. 227-250.
- FUOCO, R., CECCARINI, A., ONOR, M., LOTTICI, S. 1997. Supercritical fluid extraction combined on-line with cold-trap gas chromatography/mass spectrometry. In: *Analytica Chimica Acta*, 346, 1997, 1, p. 81-86.
- GERMUŠKA, R. 2002. Monitoring kontaminácie údených syrových korbáčikov benzo(a)pyrénom a využitie Accelerated solvent extrakcie (ASE) pri analýzach rezíduí benzo(a)pyrénu. Košice: Atestačná práca
- GOMAA, E. A., GRAY, J. I., RABIE, S., LOPEZ-BOTE, C., BOOREN, A. M. 1993. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. In: *Food Addit. Contam.*, 1993, 10, p. 503-521.
- HAWTHORNE, S. B., GRABANSKI, C. B. 2000. Correlating selective supercritical fluid extraction with bioremediation behavior of PAHs in a field treatment plot. In: *Environmental Science and Technology*, 34, 2000, 19, p. 4103-4110.
- HOLLOSI, L. 2009. Small particle columns for analysis of EU priority PAHs. In: *Zborník prednášok zo 4. stretnutia CRL-NRL v IRMM Geel, Belgicko (24.-25. marec 2009)*, nestr.
- HSIEH, Y. Z., CHANG, A. CH. 1997. Effects of analyte-matrix interactions on supercritical fluid extraction efficiencies of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Analytica Chimica Acta*, 342, 1997, 1, p. 41-50.
- JECFA (2005). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Sixty-fourth meeting, Rome, 8-17 February 2005. Summary and Conclusions. Accessed on 19 June 2005 at [http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary\\_report\\_64\\_final.pdf](http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf)
- KUBIAK, R., BELOWSKI, J., SZCZEKLIK, J., SMOLIK, E., MIELZYNSKA, D., BAJ, M., SZCZESNA, A. 1999. Biomarkers of carcinogenesis in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 445, 1999, 2, p. 175-180.
- LOPEZ-AVILA, V., BENEDICTO, J. 1996. Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15, 1996, 8, p. 334-341.
- LUQUE DE CASTRO, M. D., JIMÉNEZ-CARMONA, M. M. 2000. Where is supercritical fluid extraction going? In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19, 2000, 4, p. 223-228.
- LUTERMANN, CH., DOTT, W., HOLLENDER, J. 1998. Combined modifier/in situ derivatization effects on supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. In: *Journal of Chromatography A*, 811, 1998, 1-2, p. 151-156.
- MARAFIE, M. E., MARAFIE, I., EMERY, S. J., WATERS, R., JONES, N. J. 2000. Biomonitoring the human population exposed to pollution from the oil fires in Kuwait: Analysis of placental tissue using P-postlabeling. In: *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36, 2000, 4, p. 274-282.
- MCDANIEL, L. H., ASHRAF-KHORASSANI, M., TAYLOR, L. T. 2001. Supercritical fluid extraction of wood pulp with analysis by capillary gas chromatography-mass spectrometry. In: *The Journal of Supercritical Fluids*, 19, 2001, 3, p. 275-286.
- Nariadenie Komisie (ES) 466/2001 z 8. marca 2001, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách.
- Nariadenie Komisie (ES) 1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách.
- Nariadenie Komisie (ES) 333/2007 z 28. marca 2007, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a metódy analýzy na úradnú kontrolu hodnôt olova, kadmia, ortuti, anorganického cínu, 3-MCPD a benzo(a)pyrénu v potravinách.
- NOBUYOSHI, H., KURUNTHACHALAM, K., TAKASHI, I., VILLENEUVE, D., SHINYA, H., AKIRA, M., GIESY, J. P. 2000. Vertical profile of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, naphthalenes, biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, and alkylphenols in a sediment core from Tokyo Bay. In: *Environmental Science and Technology*, 34, 2000, 17, p. 3560-3567.
- Odporúčanie Komisie (ES) 2005/108/ES zo 4. februára 2005 o ďalšom vyšetrení hodnôt obsahu polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAU) v určitých potravinách.
- Potravinový Kódex SR, tretia hlava, príloha č.2, časť C. 1996. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR, roč. XXVIII, čiastka 14, jún 1996.
- REIMER, G., SUAREZ, A. 1995. Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the analysis of native polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. In: *Journal of Chromatography A*, 669, 1995, 1-2, p. 253-263.
- RUDZINSKI, W. E., AMINABHAVI, T. J. 2000. Review on extraction and identification of crude oil and related products using supercritical fluid technology. In: *Energy and Fuels*, 14, 2000, 2, p. 464-475.
- SALLEH, S. H., SAITO, Y., JINNO, K. 2000. An approach to solventless sample preparation procedure for pesticides analysis using solid phase microextraction/supercritical fluid extraction technique. In: *Analytica Chimica Acta*, 418, 2000, 1, p. 69-77.
- SHU, Y. Y., LAO, R. C., CHIU, CH. H., TURLE, R. 2000. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment

reference materials by microwave-assisted extraction. In: *Chemosphere*, 41, 2000, 11, p. 17-1716.

SCF (2002): Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. Accessed on 19 June 2005 at [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf)

SCHERER, G., FRANK, S., RIEDEL, K., MEGER-KOSSIEN, I., RENNER, T. 2000. Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9, 2000, 4, p. 373-380.

SIMON, R., PALME, S., ANKLAM, E. 2006. Single-laboratory validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for quantification of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in spiked smoke flavourings. In: *Journal of Chromatography A*, 2006, 1103, p. 307-313.

SMITH, C. J., PERFETTI, T. A., RUMPLE, M. A., RODGMAN A., DOOLITTLE D. J. 2001. IARC Group 2B carcinogens Reported in cigarette mainstream smoke. In: *Food and Chemical Toxicology*, 39, 2001, 2, p. 183-205.

TAKATSUKI, K., SUZUKI, S., SATO, N., USHIZAWA, I. 1985. Liquid chromatographic determination of polycyclic

aromatic hydrocarbons in fish and shellfish. In: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, 68, p. 945-949.

WONG, P. K., WANG, J. 2001. The accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in lubricating oil over time -- a comparison of supercritical fluid and liquid-liquid extraction methods. In: *Environmental Pollution*, 112, 2001, 3, p. 407-415.

XIANWEN, L., JANSSEN, H. G., CRAMERS, C. A. 1996. Investigation of parameters affecting the on-line combination of supercritical fluid extraction with capillary gas chromatography. In: *Journal of Chromatography A*, 750, 1996, 1-2, p. 215-226.

YAO, W. 1996. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons with supercritical fluid extraction and chromatography (sfe/sfc). In: *Fuel and Energy Abstracts*, 37, 1996, 2, p. 150. .

### Kontakná adresa:

Ing. Róbert Germuška, Štátny veterinárny a potravinový ústav Dolný Kubín, Janoškova 1611/58, 026 01 Dolný Kubín E-mail: [germuska@svpudk.sk](mailto:germuska@svpudk.sk)

## BIOMODULAČNÝ ÚČINOK INULÍNU V EXPERIMENTE

## BIOMODULATORY EFFECT OF INULIN IN EXPERIMENT

*Emília Hijová, Anna Chmelárová, Alojz Bomba*

### ABSTRACT

Prebiotics are nondigestible food ingredients that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth or activity of one or a limited number of resident colonic bacteria. The aim of the presented experiment was to evaluate the effect of prebiotic on chemically induced to carcinogenesis in rats feeding with high fat diet. Wistar albino rats were treated with prebiotic – inulin at the dose of 2% in high fat diet. N,N-dimethylhydrazine injection was applied in dose of 20 mg.kg<sup>-1</sup> b.w., two times at week interval. In the end of experimental period, the samples of blood nad feaces of rats were collected and used for laboratory analysis. Treatment with prebiotic inulin significantly (p<0.001) decreased enzymatic activity of bacterial enzymes  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase in feaces. Similar tendency was noticed in serum concentration of bile acids and lipid parameters (total cholesterol and triacylglyceride). Prebiotic undergoes fermentation in the colon and enhanced SCFA production - acetic acid, propionic acid and butyric acid. Prebiotics may have a potential health implications for protection against cancer.

**Keywords:** colon cancer, prebiotic, bacterial enzyme, cholesterol, triacylglycerol, SCFA

### INTRODUCTION

Colon cancer is one of the most common forms of malignant tumours in human, and its incidence is increasing (**World Health Statistics, 2008**). Diets makes an important contribution to colon cancer risk (**Hijová, Chmelárová, 2008; Bertková, Petrášová, 2009**). In order to achieve optimal digestion, absorption, and nutritional health, we must have appropriate populations of positive microflora. One of the mechanism increasing the number of beneficial bacteria in the gut is ingestion of prebiotics. Prebiotics are generally defined as nondigestible food ingredients that beneficially affect the host by selective stimulating the growth or activity of health-promoting lactobacilli and bifidobacteria. Prebiotics can complement probiotic functions and synbiotics as combination of prebiotic and probiotic might represent a novel therapeutic or preventive agents (**Trafalska, Grzybowski, 2006; Geier, Butler, Howarth, 2006; Rafter et al., 2007**).

This experimental work was designed to investigate the efficacy of prebiotic-inulin on the activity of bacterial enzymes, concentration of bile acids, short chain fatty

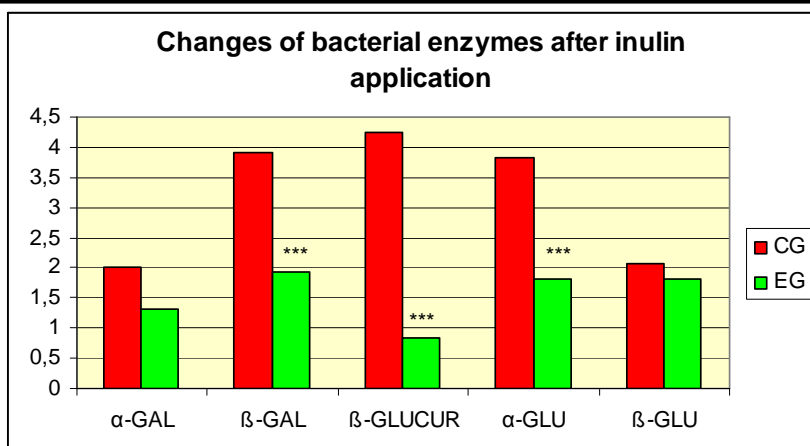
acids (SCFA), total cholesterol and triacylglycerols in rats with dimethylhydrazine induced colon cancer, also taking into consideration high intake of dietary fat as risk factor.

### MATERIALS AND METHODS

#### Animals

Wistar albino rats (n=24), (Central vivarium, Medical Faculty, P.J. Šafárik University, Košice, Slovak Republic), six months old with mean body weight 387.50  $\pm$  69.90g in control group and with mean body weight 350,83  $\pm$  32.64g in experimental group were housed in plastic cages with wire tops and maintained at 22°C, on a 12 light/dark cycle, according to the principles provided in the Law No. 289/2003 and 489/2003 of Slovak Republic for the Care and Use of Laboratory Animals. Animals were fed with high fat diet (HF) containing 10% of fat (Biofer, Slovak Republic) as the diet of some western populations at risk for colon cancer supplied with drinking water respectively, *ad libitum*. Food and drinking consumption were monitored daily.

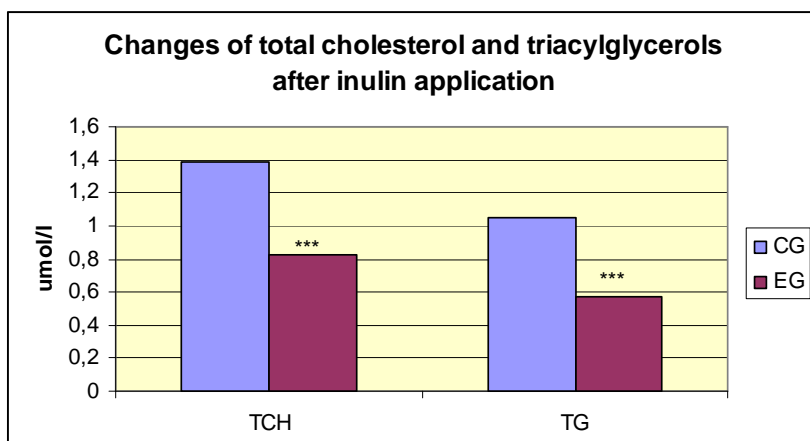
#### Treatments



**Fig. 1** α-GAL (α-galactosidase), β-GAL (β-galactosidase), β-GLUCUR (β-glucuronidase), α-GLU (α-glucosidase), β-GLU (β-glucosidase), \*\*\* p<0.001

In experimental group rats were treated with prebiotic BeneoSynergy 1 (ORAFIT, Tienen, Belgium) at a dose of 2% of HF diet. BeneoSynergy 1 is an oligofructose-enriched inulin preparation. It is a commercialized food ingredient composed of a mixture of long chain inulin and short chain oligofructose. Inulin is a natural food ingredient that is extracted from the chicory root with hot water. It is a linear β(2-1)-linked fructan with a degree of polymerization (DP) ranging from 3 to 65. Inulin chains with a DP of 2-8 (average DP:4) are oligofructoses, which are highly soluble in water (> 80%, by wt) and are rapidly fermented. The chains with a DP>12 (average DP:25) are hardly soluble in water (<5% in water at room temperature) and are slowly fermented. Both fractions are produced on a commercial scale as food ingredients worldwide. It was shown that a mixture of the 2 fractions is physiologically more efficacious than are the individual compounds (Van Loo, 2004). The product contains 95% fructan chains and 5% monosaccharides and disaccharides (fructose, glucose, and sucrose). Besides of carbohydrates, the product contains 5% humidity.

Two weeks after beginning the diets, rats were treated with N,N dimethylhydrazine (DMH, Merck, Denmark), at a dose of 20 mg kg<sup>-1</sup> s.c., two times at week interval, dietary treatments were continued for the entire experiment. In the end of eight weeks of experimental period rats were anaesthetized (Ketamin 100mg.kg<sup>-1</sup> + Xylazin 15mg.kg<sup>-1</sup> b.w., i.p.) and blood samples were taken from heart by puncture.



**Fig. 2** TCH-total cholesterol, TG-triacylglycerols, \*\*\* p<0.001

### Laboratory analysis

Samples were centrifuged at 2500 G for 15 min. and serum specimens were used for determination of bile acids concentration with commercial kit (Trinity Biotech, Ireland), and lipid parameters with commercial kits Biolatest (Czech Republic). The measurement was carried out on an automatic spectrophotometric analyser Cobas Mira S (Roche, Switzerland). Freshly collected faeces samples were examined for enzymatic activity of bacterial enzymes – α-galactosidase (α-GAL), β-galactosidase (β-GAL), β-glucuronidase (β-GLUCUR), α-glucosidase (α-GLU), β-glucosidase (β-GLU) using an API-ZYM kit (Biomérieux, France). Activities were determined according to the manufacturer's instructions and expressed on scale of 0 (negative reaction) to 5 (maximum activity). The SCFA were analyzed in the colon contents using gas chromatography Hewlett Packard (USA). The colonic pH was measured using pH meter kit with pH electrode SP 1DT (Merck, Denmark).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed by Student's t-test and analysis of variance (ANOVA) to determine the significance. Statistical significance was accepted at p<0.05.

### RESULTS

During experimental period the mean body weight of rats in the control group (CG) increased by 2.1% (395.83 ± 74.40g) and by 2.8% (360.83 ± 47.19g) in the experimental group (EG). Food consumption was changed in relationship to body weight of rats. All rats were killed six weeks after the first DMH injection. The control group represented group with the highest risk for development of colon cancer (cumulative effect of HF diet and DMH) as well as control group in comparison with prebiotic group. Changes in activity of bacterial enzymes are summarized in figure 1.

Inulin treatment significantly decreased (p<0.001) activity of bacterial enzymes β-GAL, β-GLUCUR, and α-GLU as compared to the control group. The colonic pH in experimental group significantly decreased when compared to the controls (pH (CG) = 6.29 ± 0.14 vs. pH (EG) = 6.04 ± 0.11; p<0.001). Similar tendency was observed in concentrations of total cholesterol (TCH) and triacylglycerols (TG) as shown in figure 2.

The changes in concentration of short chain fatty acids (butyric, acetic, and propionic acids) are summarized in figure 3 and concentration of bile acids are shown in figure 4.

### DISCUSSION

Prebiotics is a term coined by Gibson and Roberfroid (1995). They conceived of



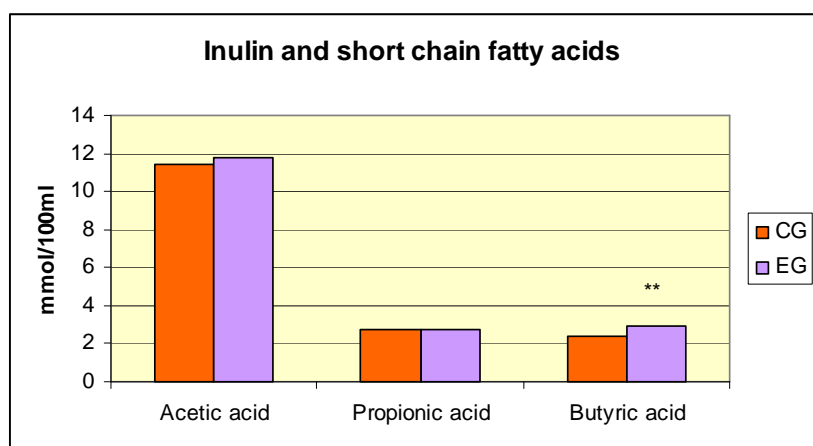


Fig. 3 Statistical significance: \*\* p<0.01

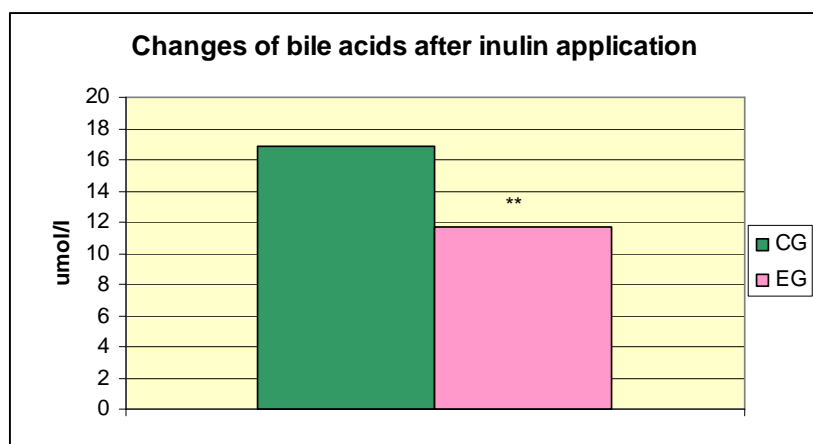


Fig. 4 Statistical significance: \*\* p<0.01

„prebiotics” and „synbiotics” which have become very popular concepts in the sciences of nutrition and were also very active in developing the concept of „functional food”. The prebiotics are generally defined as nondigestible food ingredients that beneficially affect the host by selective stimulating the growth and /or activity of one, or a limited number of bacteria in the colon that can improve the host health.

This definition was updated in 2004 (Gibson et al., 2004) and prebiotics are now defined as selectively fermented ingredients that allow specific changes, both in the composition and /or activity in the gastrointestinal microbiota that confers benefits upon host well-being and health. The latter definition does not only consider the microbiota changes in the colonic ecosystem of human, but in the whole gastrointestinal tract, and as such extrapolates the definition into other areas that may benefit from a selective targeting of particular microorganisms. In order to be effective, a prebiotic must escape digestion in the upper gastrointestinal tract so that it can be released in the lower tract and used by beneficial microorganisms in the colon, mainly bifidobacteria and lactobacilli. Unlike the probiotic bacteria, prebiotic carbohydrates are not destroyed when cooked. Prebiotic carbohydrates are found naturally in such fruit and vegetables as bananas, berries, asparagus, garlic, wheat, oatmeal, barley (and other whole grains), flaxseed, tomatoes, Jerusalem artichoke, onions and chicory, greens (especially dandelios greens, spinach, kale, mustard greens, and other), and legumes (lentils, kidney beans, white beans, black beans, peas). The various

oligosaccharides classified as prebiotic and added to processed foods and supplements include Fiber gums, Fructo-oligosaccharides (FOS), Inulins, Isomalto-oligosaccharides, Lactitol, Lactosucrose, Lactulose, Oligofructose, Pyrodextrins, Soy oligosaccharides, Transgalacto-oligosaccharides (TOS), and Xylo-oligosaccharides.

Inulins are a group of non-digestible oligosaccharides belonging to a class of carbohydrates known as fructans. Inulin-producing plant species are found in chicory, onions, leeks, garlic, bananas, asparagus and artichokes. However, only chicory (*Cichorium intybus*) and Jerusalem artichokes (*Helianthus tuberosus*) are used to produce Inulin commercially. Oligofructose is a sweet product derived from native inulin, consists mainly of fructose and is also available as a mixture with inulin. Unlike inulin, oligofructose has the ability to brown, making it a valuable addition to baked products.

Dietary carbohydrates escaping digestion/absorption in the small bowel and prebiotics undergo fermentation in the colon and enhancing short chain fatty acids production (Hijová, Chmelárová, 2007). Of these, butyrate and propionate inhibit growth of colon tumour cells and histone deacetylases. Butyrate also causes apoptosis, reduces metastasis in colon cell

lines, and protects from genotoxic carcinogens. The elevated butyric acid and acetic acid concentrations, and decreased concentrations of total cholesterol and triacylglycerol during experimental period are in accordance with research in experimental animal models which revealed that inulin-type fructans have anticarcinogenic properties (Pool-Zobel, Sauer, 2007), hypolipidaemic effect (Beylot, 2005), and anti-atherogenic effects (Rault-Nania et al., 2006). The human intervention study (SYNCAN project) provided experimental evidence that inulin modulates parameters of colon cancer risks in humans colon cells (Van-Loo et al., 2005).

Although epidemiological and experimental studies indicate an association of elevated fecal levels of secondary bile acids as well as total bile acids with high risk of colon cancer development, the cellular mechanism for the actions of bile acids is not clear (Cheng, Raufman, 2005; Hagiwara, 2006). The bile acids concentration in the control group was  $16.84 \pm 6.33 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Supplementation with prebiotic significantly ( $p<0.01$ ) decreased the bile acids concentration to  $11.72 \pm 4.22 \mu\text{mol.l}^{-1}$  in experimental group.

Elevated activity of bacterial enzymes is associated with an increased risk for various cancer. The enzymes are produced by colonic microflora and involved in phase II liver detoxification during which toxins are conjugated with glucuronic acid in the liver by glucuronidation and excreted through the enterohepatic circulation allowing the toxin to be more easily excreted from the body. The



activity of these enzymes with toxicological importance could be altered by the diet, ultimately results in potentially decreasing the risk of carcinogenesis (Nalini, Manju, Menon, 2004; Manju, Nalini, 2006). Supplementary ingestion of prebiotic inulin significantly ( $p < 0.001$ ) decreased the enzymatic activity of bacterial enzymes  $\beta$ -GAL,  $\beta$ -GLUCUR, and  $\alpha$ -GLU, probably resulted in increasing excretion of conjugated xenobiotic compounds and decreasing activity of harmful substances that are the most active in their deconjugated state. The activities of  $\alpha$ -GAL and  $\beta$ -GLU decreased nonsignificantly.

### CONCLUSION

Dietary habits have been associated with aetiology and prevention of civilization diseases that represent the most serious health, economic, and social problem. For these reasons, the interest in using the ecological methods of prevention and therapy using the substances of biotechnological and natural origin has been increasing worldwide. Among potentially protective foods, growing attention should be devoted to prebiotics which have health benefits. The prebiotic substances can be found in many foods including yogurts, cereals, breads, biscuits, milk dessert, nutrition bars, ice-creams, drinks, water and infant foods when will be adopted by the commercial industry. The results of this experiment indicated on anticarcinogenic effect of inulin against DMH induced colon cancer and may play a very important role in prevention and treatment.

### REFERENCES

- BERTKOVÁ, I., PETRÁŠOVÁ, D., 2009. Preferencia fermentovaných produktov vo výžive medikov, In *Životné podmienky a zdravie*, 2009, in press.
- BEYLOT, M., 2005. Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models, In *Br. J. Nutr.*, roč. 93, 2005, Suppl.1, s. S163-S168.
- CHENG, K., RAUFMAN, J. P., 2005. Bile acids – induced proliferation of human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors, In *Biochem. Pharmacol.*, roč.70, 2005, s.1035-1047.
- GEIER, M. S., BUTLER, R. N., HOWARTH, G. S., 2006. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? In *Cancer Biol. Ther.*, roč. 5, 2006, s.1265-1269.
- GIBSON, G. R., PROBERT, H. M., VAN LOO, J., RASTALL, R. A., ROBERFROID, M. B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics, In *Nutr. Res. Rev.*, roč. 17, 2004, s. 259-275.
- GIBSON, G. R., ROBERFROID, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the

concept of prebiotics, In *J. Nutr.*, roč. 125, 1995, s.1401-1412.

HAGIWARA, T., 2006. Bile acids and colorectal cancer, In *Japan J. Cancer Clinics*, roč. 51, 2006, s. 919-925.

HIJOVÁ, E., CHMELÁROVÁ, A. 2008. The risk of cancer in relationship to diet, In *Bratisl. Lek. Listy*, roč. 109, 2008, s. 320-323.

HIJOVÁ, E., CHMELÁROVÁ, A. 2007. Short chain fatty acids and colonic health, In *Bratisl. Lek. Listy*, roč. 108, 2007, č. 354-358.

MANJU, V., NALINI, N., 2006. Effect of ginger on bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis, In *Eur. J. Cancer Prev.*, roč.15, 2006, s. 377-383.

NALINI, N., MANJU, V., MENON, V. P., 2004. Effect of coconut cake on the bacterial enzymes activity in 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer, In *Clin. Chim. Acta*, roč. 342, 2004, s. 203-210.

POOL-ZOBEL, B. L., SAUER, J., 2007. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans, In *J. Nutr.*, roč.137, 2007, s. 2580S-2584S.

RAFTER, J., BENNETT, M., CADERNI, G., CLUNE, Y., HUGHES, R., KARLSSON, P. C., KLINDER, A., O'RIORDANI, M., SULLIVAN, G. C., POOL-ZOBEL, B., RECHKEMMER, G., ROLLER, M., ROWLAND, I., SALVADORI, M., THUIS, H., VAN LOO, J., WATZL, B., COLLINS, J. K., 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients, In *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 85, 2007, s. 488-496.

RAULT-NANIA, M. H., GUEUX, E., DEMOUGEOT, C., DEMIGNE, CH., ROCK, E., MAZUR, A., 2006. Inulin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, In *Br. J. Nutr.*, roč. 96, 2006, s. 840-844.

TRAFALSKA, E., GRZYBOWSKI, A., 2006. Probiotics and prebiotics in prevention of chronic civilization diseases, In *New Medicine*, roč. 9, 2006, s. 3-6.

VAN LOO, J., 2004. The specificity of the interaction with intestinal fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy, In *Nutr. Res. Rev.*, roč. 17, 2004, s. 89-98.

VAN LOO, J., CLUNE, Y., BENNETT, M., COLLINS, J. K., 2005. The SYNCAN project: goals, set-up, first results and setting of the human intervention study, In *Br. J. Nutr.*, roč. 93, 2005, Suppl. 1, s. S91-S98.

WORLD HEALTH STATISTICS, 2008. In *WHO Press*, Geneva, May 2008, 110 s. ISBN 9789240682740.

### Acknowledgement:

This work was supported by a project AV 4/0028/07.

### Contact address:

MVDr. Emília HijoVá, PhD.

Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta  
Univerzity P.J. Šafárika, SNP 1, 040 11 Košice, Slovenská  
republika, Tel: 055/6424606, E-mail: hijova@pobox.sk

**VPLYV KADMIA NA HISTOLOGICKÉ ZMENY V PEČENI MORIEK****THE INFLUENCE OF THE CADMIUM EXPOSURE ON THE HISTOLOGICAL CHANGES IN THE TURKEYS LIVER***Katarína Holovská jr., Viera Almášiová, Viera Cigánková, Eva Petrovová***ABSTRACT**

The aim of our study was to observe the chronic effect of cadmium ( $\text{CdCl}_2$ , decuple of permissible limit) on the structure and histological changes in the turkey's liver by means of transmission electron microscopy. The ultrastructural changes were investigated in hepatocytes after 71 days exposure to cadmium (Cd group). In our experiment, hepatocytes showed different submicroscopical structure in control and Cd group. In Cd group, ultrastructural changes included swollen mitochondria with cavitation, dilated cisternae of rough endoplasmatic reticulum, and depletion of glycogen granules. Via the formation of "extremely swollen mitochondria", mitochondria try to decrease of intracellular levels of reactive oxygen species.

**Keywords:** cadmium; liver; hepatocytes; ultrastructure; turkey

**INTRODUCTION**

Industrial uses of heavy metals led to widespread dispersion of these metals at trace levels into the natural environment. The effects of heavy metals on the health status of hens (Arpasova et al., 2007; Capcarova et al., 2008; Kolesárová et al., 2008a) and brown hares (Massányi et al., 2003; Kramárová et al., 2005b; Kolesárová et al., 2008b) were examined previously.

Cadmium is a toxic heavy metal and a well-known environmental pollutant. It is present in the soil, water, air and consequently in the food. Quantifying the transfer of cadmium from food to target organs is a key to estimating the health risk (Chan et al., 2004). Cadmium causes poisoning in various tissues of humans and animals. It is highly cumulative, especially in the liver and kidney. The bioaccumulation of cadmium is modified by many dietary components. An accumulation of cadmium in the liver and kidney of brown hares was reported (Kolesárová et al., 2008b). A significantly higher accumulation of cadmium in the kidney in comparison with the liver of wide animals was detected (Kramárová et al., 2005a; Kolesárová et al., 2008). Toxicity and metabolism of cadmium is influenced by many factor including age, sex, elements interactions and diet. The mechanism of cadmium toxicity is not fully understood.

The liver represents an important organ for the initial accumulation of cadmium in the body with high metabolic activity. The aim of our study was to observe the chronic effects of cadmium on the ultrastructure of the hepatocytes in the turkey liver.

**MATERIAL AND METHODS****Animals and diets**

The experiment was carried out on 18 female turkeys of BIG-6 breed at the age of 35 days. The animals were divided into 2 groups of 6 animals after 30 days of acclimatization. Turkeys were firstly fed with feed mixture HYD 14. HYD 15 was given from week 9 of bird age and 2 weeks before finishing of experiment the animals received feed mixture HYD 16. Food and water were offered *ad libitum*. The first group was the control (control - group C) without any treatment. The second group (group Cd) received cadmium as  $\text{CdCl}_2$  (aqueous solution) in the amount, which represents decuple of permissible limit ( $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$  of food) from day of age 65. The application time of substances was 71 days (Nad' et al., 2007). The animals were killed on the day of age 136. The

experiment was performed following ethical requirements for animal handling (Korim et al., 2003).

**Transmission electron microscopy (TEM)**

The samples intended for ultrastructural examinations were fixed in 3 % glutaraldehyde, postfixed in 1 %  $\text{OsO}_4$  (both in a phosphate buffer pH 7.2-7.4), dehydrated in acetone and embedded in Durcupan ACM. The ultrathin sections were cut on the ultramicrotome Tesla BS 490, stained with uranyl acetate and lead citrate and evaluated using a transmission electron microscope Tesla BS 500.

**RESULTS**

The morphologic characteristics of hepatocytes in the control group were clearly observed. Polygonal hepatocytes with the large nuclei were radially arranged in cords around a central vein. Also, binucleated cells were common. Mitochondria, which filled the cytoplasm, were normal in shape and size. Abundant rough endoplasmic reticulum was distributed near the mitochondria. Glycogen particles were typically arranged and form clusters of electron-dense particles.

In Cd group, obvious ultrastructure changes of hepatocytes were found. Some nuclei were deeply invaginated, irregular, with condensed chromatin. The morphologic changes of the mitochondria were clearly observed under EM. Mitochondria were swollen, with membranes that were vague, and cristae were obviously loose and dissolved. Cisternae of the rough endoplasmic reticulum (RER) were dilated. Occasionally, in the cytoplasm, there were a few round or elliptic lipid droplets. The content of glycogen was decreased as compared to the control liver cells.

**DICUSSION**

Cadmium represents a dangerous environmental and industrial pollutant. Soluble cadmium salts accumulate and result in toxicity in the various organs (Cigánková et al., 2004; Danko et al., 2005; Kramárová et al., 2005a; Lukáč et al., 2007; Massányi, 1996; Massányi et al., 2003; Massányi et al., 2007; Nad' et al., 2007; Sokol et al., 1998; Stohs and Bagchi, 1995; Toman and Massányi, 1997). The absorption following oral exposure to cadmium is likely to depend on physiological status and also on the presence and levels of ions and other dietary components ingested together with the cadmium compound.

The liver plays a key role in the most metabolic processes, especially detoxification. It is connected with the position of the liver in the circulatory system that is optimal for gathering, transforming, and accumulating of metabolites and for neutralizing and eliminating toxic substances. Various possible mechanisms have been suggested to explain the damage induced by cadmium. It is known that cadmium reacts with thiol groups of proteins and this event can affect various metabolic processes. The metal can block the functional sites of the catalytic domains of enzymes or modify the protein conformation. These changes can lead to loss of catalytical activity. Another possible mechanism could be the displacement of the metal, which is essential for biological activity of a molecule by another one. **Eybl et al. (2006)** and **Ikediobi et al. (2004)** suggest that cadmium toxicity can cause oxidative stress and that lipid peroxidation is an early and sensitive consequence of acute cadmium exposure.

In our experiment, hepatocytes showed different submicroscopical structure in experimental group. In Cd group, where the content of cadmium was 11 time higher than in control group, ultrastructural changes included swollen mitochondria with cavitation, dilated cisternae of rough endoplasmatic reticulum, and depletion of glycogen granules. Similar ultrastructural alterations were observed in the liver of birds treated with cadmium (**Eybl et al., 2006**). It has been reported that mitochondria are the most important producers of reactive oxygen species (ROS). The electron transport chain on the inner mitochondrial membrane produces superoxide radicals and they can be converted to hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide can then diffuse out of mitochondria into the cytoplasm. In the presence of metals in high concentrations, the highly reactive hydroxyl radical can form (**Szeto, 2006**). ROS can cause damage to all cellular macromolecules. Excessive ROS could directly react with unsaturated fatty acid on the surface of mitochondrial membrane, which leads to the destruction of its structure and function.

The extent to which ROS yield oxidative stress depends upon the effectiveness of antioxidant defence and significant damage occurs only if antioxidant defences are overwhelmed. Superoxide dismutase (SOD) as a scavenger of superoxide radicals in biological tissues keeps the concentration of superoxide radicals in low limits and therefore plays an important role in the protection against free radical damage (**Fridovich, 1997**). It has been reported that SOD evoked varied responses to cadmium that are concentration-, cell type- and frequency of exposure-dependent (**Ikediobi et al., 2004**). **Sobeková et al. (2008)** showed that cadmium affected the activity of SOD. The specific activity of SOD was significantly increased in Cd group. The observed increase in SOD activity is a response to accumulation of ROS. Mitochondria try to decrease intracellular ROS levels by decreasing consume of oxygen via the formation of "extremely swollen mitochondria" or "megamitochondria" (**Wakabayashi, 2002**).

One of the markers of oxidative damage of membrane lipids is the TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) content in tissues. Cadmium induced ultrastructural changes in hepatocytes were not accompanied by significant increase in the tissue content of TBARS (**Sobeková et al., in press**). It is possible that the TBARS content did not increase due to the function

also of the other protective systems. The liver is one of the major sites where the metal-binding protein metallothionein is synthesized in response to metals exposure. Exposure to metals can induce the synthesis of metallothioneins, low molecular weight proteins with high sulfhydryl content, which bind up to 90% of the metal accumulated in the liver and is redistributed slowly in the other organs especially in the kidneys (**Massányi et al., 2003**). The liver controls the availability of cadmium to other target organs. Metallothionein may be a compensatory protect mechanism.

### CONCLUSION

The results showed that cadmium induced morphological changes of hepatocytes include changes in nuclei, dilated cisternae of rough endoplasmatic reticulum and swollen mitochondria.

### REFERENCES

- ARPÁŠOVÁ, H., CAPCAROVA, M., KALAFOVÁ, A., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., FORMICKI, G., MASSÁNYI, P., 2007. Nickel induced alteration of hen body weight, egg production and egg quality after an experimental peroral administration. In *J. Environ. Sci. Health., Part B*, roč. 42, 2007, č. 8, s. 913-918.
- CAPCAROVA, M., KOLESÁROVÁ, A., ARPÁŠOVÁ, H., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., KALAFOVÁ, A., SCHNEIDGENOVÁ, M., 2008. Blood Biochemical Dynamics and Correlations in Laying Hens after Experimental Nickel Administration. In *Int. J. Poultry Sci.*, roč. 7, 2008, č. 6, s. 538-547.
- CIGÁNKOVÁ, V., NAĎ, P., KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M., HOLOVSKÁ, K., 2004. Histologické zmeny v obličkách Japonských prepelíc (*Coturnix coturnix japonica*) po podaní kadmia. In *Rizikové faktory potravinového reťazca* Nitra, 2004, s. 32 – 33. ISBN 80-8069-415-X.
- CHAN, D. Y., FRY, N., WAISBERG, M., BLACK, W. D., HALE, B. A., 2004. Accumulation of dietary cadmium (Cd) in rabbit tissues and excretions: A comparison of lettuce amended with soluble Cd salt and lettuce with plant-incorporation Cd. In *J. Toxicol. Environ. Health.*, roč. 67, 2004, č. 5, s. 397-411.
- CHISHTI, M. A., ROTKIEWICZ, T., 1993. Hepatic and renal ultrastructural changes in cockerels exposed to cadmium chloride and subsequent interaction with organophosphate insecticide. In *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, roč. 12, 1993, č. 1, s. 35-45.
- DANKO, J., LEŠNÍK, F., JENČA, A., et al., 2005. Xenobiotiká vo vzťahu k zdraviu. UVM and LF UPJŠ, Košice, 2005. ISBN 80-8077-015-8.
- EYBL, V., KOTYZOVÁ, D., KOUTENSKY, J., 2006. Comparative study of natural antioxidants-curcumin, resveratrol and melatonin-in cadmium- induced oxidative damage in mice. In *Toxicol.*, roč. 225, 2006, č. 2/3, s. 150-156.
- FRIDOVICH, I. J., 1997. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases and related matters. In *Biol. Chem.*, roč. 272, 1997, č. 30, s. 18515-18517.
- IKEDIABI, CH. O., BADISA, V. L., AYUK-TAKEM, L. T., LATINWO, L. M., WEST, J., 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. In *Int. J. Mol. Med.*, roč. 14, 2004, č. 1, s. 87-92.
- KOLESÁROVÁ, A., CAPCAROVA, M., ARPÁŠOVÁ, H., KALAFOVÁ, A., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., SCHNEIDGENOVÁ, M., 2008a. Nickel-

induced blood biochemistry alterations in hens after an experimental peroral administration. In *J. Environ. Sci. Health.*, Part B, roč. 43, 2008a, č. 7, p.625-632.

KOLEŠÁROVÁ, A., SLAMEČKA J., JURČÍK, R., TATARUCH, F., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., CAPCAROVA, M., VÁLENT, M., MASSÁNYI, P., 2008b. Environmental levels of cadmium, lead and mercury in brown hares and their relation to blood metabolic parameters. In *J. Environ. Sci. Health.*, Part A, roč. 43, 2008b, č. 6, s. 646-650.

KORIM, P., BUGARSKÝ, A., JURÍŠ, P., HADBAVNÝ, M., KORIMOVÁ, M., 2003. Protection of experimental animals. In *Slov. Vet. J.*, roč. 28, 2003, s. 10-12.

KRAMÁROVA, M., MASSÁNYI, P., JANČOVÁ, A., TOMAN, R., SLAMEČKA, J., TATARECH, F., KOVÁČIK, J., GAŠPARÍK, J., NAĎ, P., SKALICKÁ, M., KORÉNEKOVÁ, B., JURČÍK, R., ČUBOŇ, J., HAŠČÍK, P., 2005a. Concentration of cadmium in the liver and kidneys of some wild and farm animals. In *Bull. Vet. Pulawy.*, roč. 49, 2005a, č. 4, s. 465-469.

KRAMÁROVÁ, M., MASSÁNYI, P., SLAMEČKA, J., TATARUCH, F., JANČOVÁ, A., GAŠPARÍK, J., FABIŠ, M., KOVÁČIK, J., TOMAN, R., GÁLOVÁ, J., JURČÍK, R. 2005b. Distribution of cadmium and lead in liver and kidney of some wild animals in Slovakia. In *J. Environ. Sci. Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.*, roč. 40, 2005b, č. 3, p. 593-600.

LUKÁČ, N., et al., 2007. Stopové prvky a kvalita spermií. VŠP, 2007, p. 1-118. ISBN 978-80-8069-904-8.

MASSÁNYI, P., 1996. Štrukturálne zmeny vaječníka, vajcovodu a maternice samice kráľíka po podaní kadmia. VŠP, 1996, p. 1-61. ISBN 80-7137-336-2.

MASSÁNYI, P., TATARUCH, F., SLAMEKA, J., TOMAN, R., JURČÍK, R., 2003. Accumulation of Lead, Cadmium, and Mercury in Liver and Kidney of the Brown Hare (*Lepus europaeus*) in Relation to the Season, Age, and Sex in the West Slovakia Lowland. In *J. Environ. Sci. Health.*, reč.38, 2003, č. 7, s. 1299-1309.

MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., MAKAREVICH, A. V., CHRENEK, P., FORGÁCS, Z., ZAKRZEWSKI, M., STAWARZ, R., TOMAN, R., LAZOR, P., FLEŠÁROVÁ, S., 2007. Lead-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. In *J. Environ. Sci. Health.*, Taylor & Francis Group, part B, roč. 42, 2007, č. 7, s. 671-676.

NAĎ, P., MASSÁNYI, P., SKALICKÁ, M., KORÉNEKOVÁ, B., CIGÁNKOVÁ, V., ALMÁŠIOVÁ, V., 2007. The effect of cadmium in combination with zinc and selenium on ovarian structure in Japanese quails. In *J. Environ. Sci. Health.*, roč. 42, 2007, č. 13, s. 2017-2022.

NAĎ, P., SKALICKÁ, M., KORÉNEKOVÁ, B., PISTL, J., 2008. Eliminácia toxických účinkov kadmia na produkčné zdravie hydiny esenciálnymi chemickými prvkami. In *Ekológia a veterinárna medicína VII* [Ecology and veterinary medicine]:collected papers from international scientific conference. Košice: ÚVL, 2008, s. 110-114. ISBN 978-80-8077-084-6.

SOBEKOVÁ, A., HOLOVSKÁ, K., NAĎ, P., SKALICKÁ, M., 2008. The chronic cadmium exposure in the turkeys parenchymal tissues. In *Priemyselná toxikológia 08* [Industrial toxicology]: collected papers. Tatranská Štrba, 2008, s. 378-382. ISBN 978-80-227-2877-5.

SOBEKOVÁ, A., HOLOVSKÁ, K., NAĎ, P., SKALICKÁ, M., JAVORSKÝ, P., Response of antioxidant enzymes to the chronic cadmium exposure in the turkey's parenchymal tissues. In *J. Environ. Sci. Health*, in Press.

SOKOL, J., UHRÍN, V., MASSÁNYI, P., BREYL, I., UHRÍN, P., 1998. Kadmium a jeho výskyt v organizme živočíchov. ŠVS SR, 1998, 114s. ISBN 80-7148-022-3.

STOHS, S. J., BAGCHI, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. In *Free Radical Biol. Med.*, roč. 18, 1995, č. 2, s. 321-336.

SZETO, H. H., 2006. Cell-permeable, Mitochondrial-targeted, Peptide Antioxidants. In *AAPS J.*, roč. 8, 2006, č. 2, s. 277-283.

TOMAN, R., MASSÁNYI, P., 1997. Štrukturálne zmeny semenníka a prisemenníka po podaní kadmia. Nitra: VŠP, 1997, s. 1-69. ISBN 80-7137-420-2.

WAKABAYASHI, T., 2002. Megamitochondria formation – physiology and pathology. In *J. Cell. Mol. Med.*, roč. 6, 2002, č. 4, s. 497-537.

**Contact address:**

MVDr. Katarína Holovská, PhD., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Ústav histológie a embryológie, Komenského 73, Košice 041081, Tel.: 0905637678, E-mail: kholovska@uvm.sk

**ORGANOCHLORINE PESTICIDES AS FOOD CHAIN RISK FACTORS**

*Eliza Chodkowska, Bernadetta Świątek, Alicja Zachara*

**ABSTRACT**

Pesticides are a group of compounds applied in agriculture in order to protect plants against any kind of pest. It should be however remembered that those substances may be accumulated in agricultural products and in that way enter food chain. The excessive content of pesticides in food may cause unwanted interactions in human organism and as a consequence various illnesses, including cancers, children growth disorders and immune system damages. In Poland maximum residue levels of pesticides in food are regulated by Commission Regulation (EC) no 149/2008 of 29 January 2008. Poland has participated in the European system of monitoring pesticides residues in food since 2004, and the executors of analytical procedure are Sanitary and Epidemiological Stations, comprising Provincial Sanitary and Epidemiological Station in Rzeszów. Organochlorine compounds including dieldrin, chlordane, endrin, DDT, heptachlor, and hexachlorobenzene are one of the most dangerous group of pesticides. Therefore the purpose of this paper is to show fluctuations of the levels of organochlorine pesticides in both Polish and imported fruits and vegetables in the years 2004-2008. The investigation carried out with the use of gas chromatography method shows that this type of compounds are detected in relatively small quantity of fruit and vegetable samples and their content is in most cases below maximum pesticides residues according to the law. It may signify an efficient elimination of products containing organochlorine pesticides from Polish food market.

**Keywords:** organochlorine pesticides, food contamination, food analysis, pesticides in food, regulations on pesticides content in food, Rzeszów Epidemiological and Sanitary Station

## INTRODUCTION

Pesticides are defined as substances or mixtures of substances used to prevent, destroy and control any pest including vectors able to transfer illnesses on animals or humans as far as unwanted species of plants and animals causing damages during production, processing, storage and trading of food, other agricultural products, wood, wooden products and animal feed as far as substances introduced directly into animals' organisms in order to control the quantity of insects and other pest present in their bodies. Inorganic substances of that type, such as arsenium or sulphur were applied as early as in ancient Greek and Roman times, in XIX century nicotine from tobacco leaves, pyrethrum infusion, soap solution, sulphur, lime and copper arsenide were popular and at the beginning of XX century first mecurioorganic compound for seed dressing use was synthesized. A fast development of organic pesticides synthesis was initiated with discovering of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) insecticide properties and synthesis of phosphoorganic compounds (Dich et al., 1997). Currently, the yearly production of pesticides all over the world equals to hundred thousand of tones and 45 thousand of tones goes to European market. The role of those compounds comprises not only crops' protection, but also fighting against vector-borne human diseases such as: malaria, onchocerciasis, scistosomiasis, African trypanosomiasis, dengue fever, Japanese encephalitis and leishmaniasis. However, numerous research prove that pesticides are not indifferent towards health of people working in the domain of agriculture as far as inhabitants of areas in which substances of that kind are applied and consumers of contaminated food (Chrisman et al., 2009, Carozza et al., 2009, Mozzachio et al., 2008). Stockholm Convention signed by 122 countries on 23rd of May 2001 banned production and usage of extremely dangerous pesticides such as aldrin, chlordane, dieldrin, heptachlor, mirex and toxaphene, while a possibility of DDT usage was reduced to the fight against vector-borne diseases and the total prohibition of that pesticide is being planned for the nearest future. Additionally, the Convention banned the production of hexachlorobenzene which should disappear from the market till 2025 (UNEP, 2001). Nevertheless all those compounds are still used in developing countries (Wilson and Tisdell, 2001). It is also clear that many pesticides applied in developed countries such as aldicarb or DBCP have a negative impact on human organism (www.pan-uk.org). Poisoning, with a possible lethal effect may be a one of consequences of pesticide usage and such cases appear commonly in developing countries where farmer's contact with hazardous pesticide is direct, while a consciousness of protective clothes dressing necessity is still scarce (Chrisman et al., 2009). Pesticides which enter food chain becoming food contaminants may disturb immune system as far as induce changes in endocrine system which may result in birth defects, sexual abnormalities and reproductive failure. The list prepared by British Pesticide Action Network on the basis of scientific data comprises 101 pesticides which can possibly influence human endocrine system. A carcinogenic effect of some pesticides is also well known. Pesticide Action Network List mentions 240 of compounds which may cause numerous cancers including

soft tissue sarcoma, malignant lymphomas, multiple myeloma, leukemia, cancers of the skin, prostate, testis, lung and brain (www.pan-uk.org). Some data suggest a possibility of pesticides' influence on the breast, endometrium, kidney, liver, bladder, ovary, stomach and thyroid cancers' occurrence (Dich et al., 1997).

First organochlorine pesticides were synthesized and introduced into production in the middle of XX century (Khanjani et al., 2006). 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane known under a short name as DDT was applied from the beginning of forties in XX century. Commercial DDT agent contains additionally dichlorodiphenyldichlorethane- DDD (up to 4%) and- in smaller amounts dichlorodiphenyldichlorethene (DDE). Because of the negative impact on human health the production of that pesticide was forbidden in many countries in the seventies of last century (Chung et al., 2008). In the nineties the occurrence of various illnesses like circulatory and respiratory system problems, liver and bile duct cancers as far as multiple myeloma and leukemia were associated with DDT (Cocco et al., 1997). In the end of forties chlordane appeared on American market- the agent contained over 140 of different compounds, including the most important three:  $\alpha$ -(*cis*)-chlordane,  $\gamma$ -(*trans*)-chlordane and *trans*-nonachlore. The restrictions of chlordane application owing to its possible adverse health effect have been gradually introduced in eighties of XX century (White et al., 2002). Now it is clear that chlordane may cause damages of central nervous system, circulatory system and gastrointestinal system (U.S. Environmental Protection Agency, 1987). Chlordane in eighties was qualified as one of potential carcinogens (National Institute for Occupational Safety and Health, 1981-1986). In fifties two other organochlorine insecticides were brought into production: they were aldrin and product of its degradation called dieldrin. Their insecticide properties occurred more efficient than those of DDT in many cases, however also those compounds were put on the list of potential carcinogens in eighties. The pesticides mentioned may also produce damages of liver, central nervous system, immune system, interrupt the action of endocrine system and induce embryo defects. Endrin is an enantiomer of dieldrin, initially used as an insecticide agent on the cotton farms (Stevenson et al., 1999). It may affect nervous system, and additionally if absorbed with food may cause poisoning, especially in the case of children (U.S. Environmental Protection Agency, 1991). Another organochlorine pesticide introduced into the market in fifties was heptachlor used mainly for the protection of crops against termites and soil insects. Because of confirmed high toxicity toward animal and human organisms its production stopped in developed countries in the end of seventies (Fenoglio et al., 2009). Both heptachlor and product of its metabolism, heptachlor epoxide are neurotoxic compounds and may induce negative effects in kidneys and liver. According to EPA classification heptachlor is placed on the list of potential carcinogens (U.S. Environmental Protection Agency, 1987). Hexachlorobenzene belongs to organochlorine fungicides and was commonly used until the middle sixties (Falco et al., 2008). Presently it is added to the EPA list as a potential carcinogen, additionally it was proven that it may negatively affect skin, liver and connective tissue.

This pesticide may also induce the damages of embryos (U.S. Environmental Protection Agency, 1988). Despite confirmed toxicity of organochlorine pesticides including compounds mentioned above, they are still allowed in many developing countries and in developed countries they may form together with their metabolites a contamination accumulated in soil. Owing to that fact a random control of products appearing on our market seems necessary.

The monitoring of pesticides and their degradation products in foodstuff is supposed to serve the estimation of

**Table 1:** Maximum residue level of chosen organochlorine pesticides in chosen fruits and vegetables, while dieldrin is aldrin and dieldrin combined expressed as dieldrin, chlordane is *cis*- and *trans*-chlordane combined, DDT is *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDE and *p,p'*-TDE combined expressed as DDT, heptachlor is heptachlor and heptachlor epoxide combined expressed as heptachlor, endosulfan is a sum of alpha- and beta-isomers and endosulfan sulphate expressed as endosulfan.

Pesticide:	Maximum residue level in sample (mg/kg):		
	peaches	pepper	egg-plant
Dieldrin	0,01	0,01	0,01
Chlordane	0,01	0,01	0,01
DDT	0,05	0,05	0,05
Endrin	0,01	0,01	0,01
Hexachlorobenzene	0,01	0,01	0,01
Heptachlor	0,01	0,01	0,01
Endosulfan	0,05	1	0,05
Lindane	0,01	0,01	0,01
Chlorothalonil	1	2	2

the level of danger for a given population. Poland has participated in European system of pesticides' monitoring in food since 2004 and the determination of those substances is being performed as a part of food controlling system- the alimentary products present on the market cannot contain more pesticides than the amount which equals to maximum residue levels of pesticide. From 1st September 2009 maximum residue levels of pesticides in food on Polish market undergo European Community Commission Regulation no 149/2008 of 29th January 2009 (Official Journal of the European Union, 2008). Maximum residue levels of nine pesticides which are a subject of this paper in exemplary fruits and vegetables which underwent analytical procedure in Sanitary and Epidemiological Station in Rzeszów are shown in table 1: Till 1st September 2009 the Directive of Health Minister of 4 July 2007 concerning maximum residue levels of pesticides which may contaminate alimentary products or their surface was valid in Poland. For the analyzed groups of fruits and vegetables maximum residue levels of above pesticides was the same as in Regulation of 29th January 2009 (Dz.U. no 119/2007). The former Directive of Health Minister of 16th April 2004 imposed the same maximum residue levels and the way of expressing the total amount of DDT, endrin, heptachlor, chlorothalonil and lindane and with some exceptions (for example in peaches) the same maximum residue levels of endosulfan, while the Directive

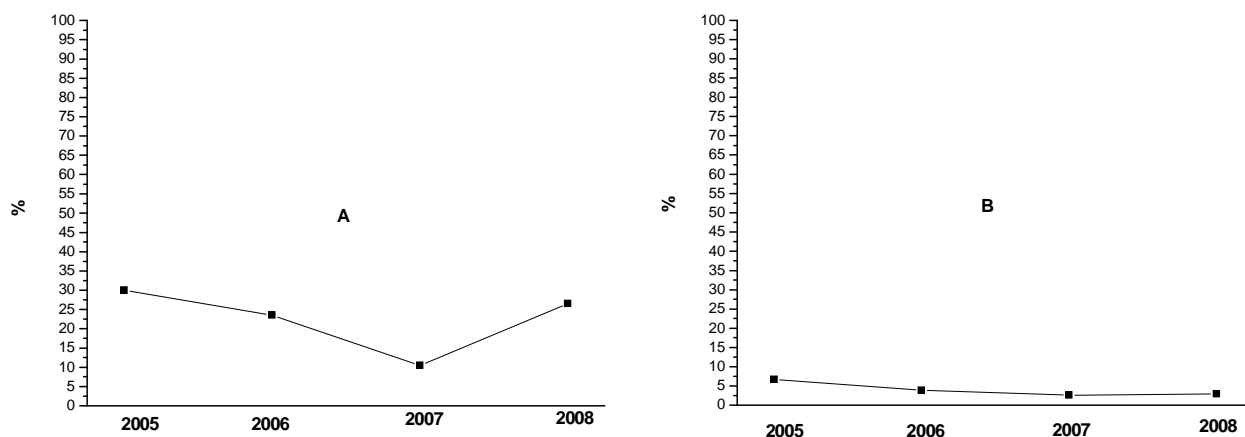
of Health Minister of 24 February 2005 which introduced changes into the previous directory concerning maximum residue levels of chemical plant protection agents which may contaminate alimentary products or their surface concerned among others dieldrin, chlordane and heptachlor, maximum residue levels of their content and the way of expressing the total amount of those pesticides remain unchanged until today. The Directive from 16th April 2004 notified about maximum residue levels for those pesticides in tea only (respectively 0.02 mg/kg for dieldrin and chlordane and 0.01 mg/kg for hexachlorobenzene), while Directive from 24th February 2005 established additionally maximum residue levels of dieldrin in fruits, parsnip, other root and bulbiferous vegetables, cucumbers, melon, water melon, fruit vegetables, leaf and stem vegetables, fresh herbs, pulse vegetables, seeds of oil plants, potatoes, hop and other plant-derived alimentary products and of chlordane and hexachlorobenzene in fruits, vegetables, pulse vegetables, seeds of oil plants, hop and other plant-derived alimentary products (Dz.U. nr 85/2004 and Dz.U. nr 48/2005).

## MATERIALS AND METHODS

The investigation was carried out in Regional Sanitary and Epidemiological Station in Rzeszów as a part of standard food control in the years 2005-2008. The purpose of analysis was to determine the pesticides residues in fruits and vegetables samples and referring them to the directive valid in a given period. The total number of investigated fruit and vegetable samples was 153, including 64 samples of nectarines and peaches, 43 samples of red, green and yellow pepper, 31 samples of egg-plant, 5 samples of tomatoes, 2 samples of radish, 2 samples of pears and one sample of kohlrabi, cauliflower, cabbage, cucumber, salad and potato, 30 of those samples were analyzed in 2005, 51 in 2006, 38 in 2007 and 34 in 2008. The samples were both of Polish origin and imported. Organochlorine pesticides in the samples investigated were analyzed according to Polish standards: PN-EN 1239-2: 2000 p.7 and PN-EN 12393-3: 2000 p.4 with the use of gas chromatography. The organochlorine pesticides being a subject of this work are: dieldrin, chlordane, DDT, endrin, hexachlorobenzene, heptachlor, endosulfan, chlordane and chlorothalonil.

## RESULTS

Table 2 shows contain of pesticides with a special attention given to organochlorine pesticides in fruits and vegetables produced in Poland and imported with division into four years, from 2004 to 2008. Both for total contain of pesticides and for contain of organochlorine pesticides the percentage of samples with those compounds was higher for imported products then for the products of Polish origin, in 2005 no pesticide was detected in Polish samples while 34.6% of imported samples contained pesticides, including 7.7% of samples with organochlorine pesticides. In 2006 a content of pesticides was stated in 21.4% of Polish samples and in 24.3% of imported samples, and organochlorine pesticides were detected respectively in 7.1% and 8.1% of samples. In 2007 no pesticide contain was stated in Polish fruits and vegetables, while those compounds were detected in 21% of imported



**Figure 1** Contain of pesticides in Polish and imported fruits and vegetables being a subject of investigation: A/ total % of samples with pesticides, B/ % of samples with organochlorine pesticides.

**Table 2** Contain of pesticides in samples investigated in years 2005-2008: PL=Polish, I=Imported.

Year of investigation	Type of sample	Number of samples	% of samples containing pesticides	% of samples containing organochlorine pesticides
2005	fruits PL	2	0	0
	fruits I	16	25	0
	vegetables PL	2	0	0
	vegetables I	10	50	20
2006	fruits PL	-	-	-
	fruits I	20	25	5
	vegetables PL	14	21,4	7,1
	vegetables I	17	23,5	11,8
2007	fruits PL	4	0	0
	fruits I	13	23,1	7,7
	vegetables PL	15	0	0
	vegetables I	6	16,7	0
2008	fruits PL	4	25	0
	fruits I	7	57,1	0
	vegetables PL	13	15,4	0
	vegetables I	10	10	10

samples including 5.2% of samples with organochlorine pesticides. In 2008 the percentage of Polish samples containing pesticides equaled 17,6, and none of those samples contained organochlorine pesticides, in the case of imported samples the relative percentages equaled 29.4 and 5.9. Figure 1 presents the changes in percentages of pesticide contain in fruits and vegetables (A) with special attention given to organochlorine pesticides (B) in years 2004-2008. It seems that contain of organochlorine pesticides in fruits and vegetables entering Polish market tends to decrease which is undoubtedly positive.

**REFERENCES**

CAROZZA, S. E., LI, B., WANG, Q., HOREL, S., COOPER, S., 2009. Agricultural pesticides and risk of childhood cancer, In *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 212, 2009, p. 186-195.  
 CHRISMAN DE REZENDE, J., KOIFMAN, S., SARCINELLI DE NOVAES, P., COSTA MOREIRA, J., JORGE KOIFMAN, R., MEYER, A., 2009. Pesticide sales and adult male cancer mortality in Brazil, In *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 212, 2009, p. 310-321.

CHUNG, S. W. C., KWONG, K. P., YAU, J. C. W., 2008. Dietary Exposure to DDT od Secondary school students in Hong Kong, In *Chemosphere*, vol. 73, 2008, p. 65-69.  
 COCCO, P., BLAIR, A., CONGIA, P., SABA, G, ECCA, A.R and PALMAS, C. 1997. Long-term health effects of the occupational exposure to DDT. A preliminary report, In *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 837, 1997, p. 246-256.  
 Commission Regulation (EC) No 149/2008 of 29 January amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I.  
 DICH, J., HOAR ZAHM, S., HANBERG, A., ADAMI, H. O., 1997. Pesticides and cancer, In *Cancer Causes and Control*, vol. 18, 1997, p. 420-443.  
 FALCO, G., LLOBET, J. M., BOCIO, A., DOMINGO, J. L., 2008. Exposure to hexachlorobenzene through fish and seafood consumption in Catalonia, Spain, In *Science of the Total Environment*, vol. 389, 2008, p. 289-295.  
 FENOGLIO, C., GROSSO, A., BONCOMPAGNI, E., GANDINI, C., MILANESI, G., BARNI, S., 2009. Exposure to heptachlor: Evaluation of the effects on the larval and adult epidermis of Rana kl. esculenta, In *Aquatic Toxicology*, vol. 91, 2009, p. 151-160.  
<http://www.cdc.gov/niosh>  
<http://www.epa.gov>  
<http://www.pan-uk.org/List of Lists.html>  
 KHANJANI, N., ENGLISH, D. R., SIM, M. R., 2006. An Ecological Study of Organochlorine Pesticides and Breast Cancer in Rural Victoria, Australia, In *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 50, 2006, p. 452-461.  
 MOZZACHIO, A. M., RUSIECKI, J. A., HOPPIN, J. A., MAHAJAN, R., PATEL, R., BEANE-FREEMAN, L., ALAVANJA, M. C., 2008. Chloroethalonil exposure and cancer incidence among pesticide applicator participants in the agricultural health study, In *Environmental Research*, vol. 108, 2008, p. 400-403.  
 Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 kwietnia 2004 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości chemicznych środków ochrony roślin, które mogą znajdować się w środkach spożywczych lub na ich powierzchni (DzU Nr 85, poz. 801, 2004).  
 Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 24 lutego 2005 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości chemicznych środków ochrony roślin, które mogą znajdować się w



środkach spożywczych lub na ich powierzchni (DzU Nr 48, poz. 460, 2005).

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 maja 2007 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów, które mogą znajdować się w środkach spożywczych lub na ich powierzchni (DzU Nr 119, poz. 817, 2007).

STEVENSON, D. E., WALBORG JR, E. F., NORTH WARNER, D., SIELKEN JR, R. L., ROSS, C. E., WRIGHT, A. S., XU, Y., KAMENDULIS L. M., KLAUNIG J. E. 1999. Monograph: Reassessment of human cancer risk of aldrin/dieldrin, In *Toxicology Letters*, vol. 109, 1999, p. 123-186.

UNEP, 2001. Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, UNEP/POP/Conf/2, May 2001.

WHITE, J. C., MATTINA, M. J. I., EITZER, B. D., BERGER-LANNUCCI, W., 2002. Tracking chlordanes compositional and chiral profiles in soil and vegetation, In *Chemosphere*, vol. 47, 2002, p. 639-646.

WILSON, C., TISDELL, C., 2001. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs, In *Ecological Economics*, vol. 39, 2001, p. 449-462.

### Contact address:

Eliza Maria Chodkowska, Katedra Chemii i Toksykologii Żywności, Wydział Biologiczno-Rolniczy Uniwersytetu Rzeszowskiego, ul. Ćwiklińskiej 2, 36-601 Rzeszów

## INFLUENCE OF SMOKING ON MERCURY CONTAMINATION OF BREAST MILK IN RELATION WITH AGE OF NURSING WOMEN FROM SOUTHERN POLAND

*Katarzyna Kilian, Zofia Goc, Grzegorz Formicki, Robert Stawarz*

### ABSTRACT

The aim of this study was determination of the concentration of mercury in human milk taken from smoking and non-smoking women from different age groups. The study subjects were recruited from among the lactating women who live permanently in Malopolska district (South Poland). Milk samples were taken from 60 mothers who were classified into two age groups (25-30 years old group, and 31-38 years old group). Milk samples were taken during first week of lactation. The samples were taken by manual expression every morning; they were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and analyses were done after all samples had been collected. Mercury contents were determined by the cold vapor atomic absorption spectrometry method with MA-2 spectrophotometer. The Hg level in milk samples was expressed in micrograms per liter ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The contents of mercury in all samples were within the range from 1.05 to  $3.73\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (median:  $1.99\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The mean concentration of mercury in milk taken from smoking women from first group (25-30 years) was  $2.30\pm 0.88\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , from second group (31-38 years old) was  $1.97\pm 0.44\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Mercury level in milk from non-smoking young woman (25-30 years old) was  $1.78\pm 0.41\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and from older women (31-38 years) was  $1.92\pm 0.34\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . One – way ANOVA, followed by Levene's test, was performed. There were statistically significant differences between mercury contents in milk samples from smoking and non-smoking young mothers (25-30 years old).

**Keywords:** mercury, breast milk, smoking

### INTRODUCTION

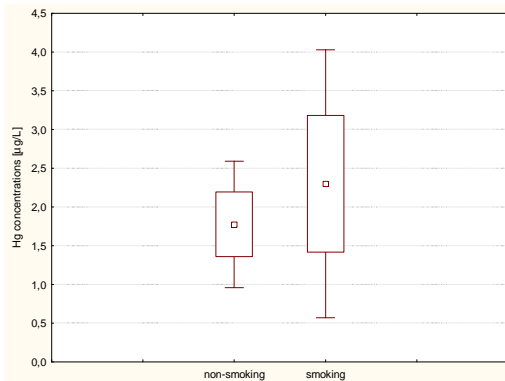
Mercury is one of the dangerous xenobiotic metals which can cause damage in human organism. It occurs in three chemical forms: uncreative elemental mercury, inorganic mercurial salts and organic mercurials (most hazardous organic mercurial is methylmercury). Mercurials can attract the sulfhydryl groups and bind to proteins on membranes and enzymes. Methyl mercury can penetrate the red blood cells and bind to hemoglobin. Elemental and methyl mercury can also cross the blood-brain barrier. There are many ways of mercury exposure like inhalation, ingestion, aspiration. Inhalation of mercury vapor is almost completely absorbed and 75% is retained. Organs which can be damage in this manner are brain, kidneys, gastrointestinal track and lungs. Mercury is also extremely dangerous for the fetus because can cross the placenta. Dysfunction like ataxia, brain damage, profound mental retardation, chorea, anemia, renal dysfunction, spasticity, cerebral palsy is linked to utero exposure (**Graeme and Pollack, 1998**). Two major forms of mercury can enter breast milk. The most hazardous, methyl mercury, does not enter breast milk at high rates because it is attached to red blood cells. Little does can be absorbed from milk in the intestine of a nursing infant. However, the inorganic

mercury enters breast milk, but is not well absorbed in the gastrointestinal system of the newborn. Swedish study found that the breast milk in the early months of breastfeeding consist primarily inorganic mercury from dental amalgam fillings. Unlike, after two months of lactation, in milk was found primarily methyl mercury associated with the mother's fish consumption, rather than dental amalgam fillings (**Oskarsson, et al., 1996**).

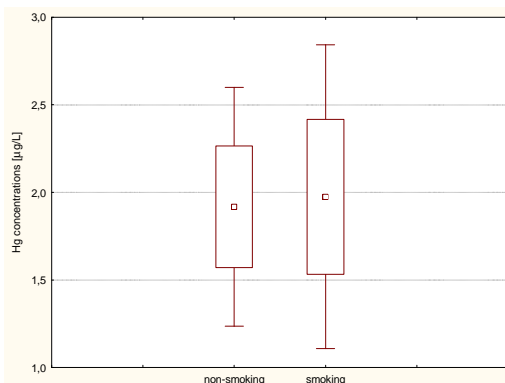
Cigarettes have been used by humans for many of years. Tobacco smoke contains more than 4000 different substances including various carcinogens and toxic metals such as: lead, cadmium, chromium, and nickel (**Dżugan and Juszczyk, 2000**). Moreover, cigarette smoke contains up to  $11.7\pm 1.2\ \text{ng/cigarette}$  of mercury (**Panta et al., 2008**). Mercury exists in the tobacco plant as a result of its deposition from the air, combined with the soil uptake of mercury by the growing roots. All toxic, carcinogenic and mutagenic chemicals, free radicals and reactive oxygen species (ROS) in the particulate and the gas phase are the potential factors for biological oxidative damage. Free radicals can damage proteins, DNA, lipids and carbohydrate. Cigarette smoking is hazardous factor which can cause diseases like cancers, ulcers, respiratory diseases and cardiovascular diseases. (**Valavanidis et al., 2009**).

Some study suggested that smoking has a negative influence on milk volume, what caused that energy requirements of the infants are unfulfilled because of that infant growth of smoking mothers is lower (Hopkinson et al., 1992).

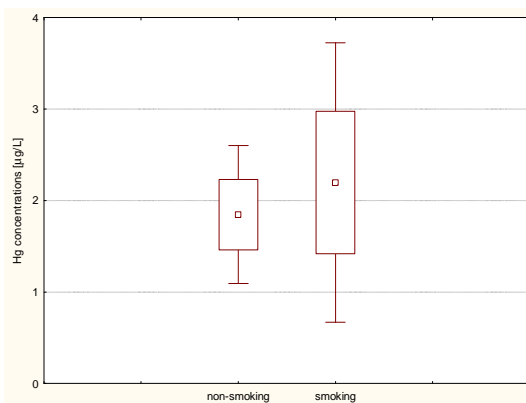
The aim of the study was determination of the concentration of mercury in human milk taken from smoking and non-smoking women from different age groups.



**Figure 1** The total mercury concentrations in milk from non-smoking and smoking women in age of 25-30 years.



**Figure 2** The total mercury concentrations in milk from non-smoking and smoking women in age of 31-38 years.



**Figure 3** The total mercury concentrations in milk from non-smoking and smoking women.

## MATERIALS AND METHODS

The study subjects were recruited from among the lactating women from malopolska district in Poland who had given birth to a mature baby in three hospitals in

Cracow. Women had been informed about the aim of the study and gave their permission for collecting milk. All women were in good health condition. We classified mothers taking into account two factors: age and smoking habits. According to the various age of the women they were segregated into two groups: 25-30, 31-38 years. Each group was divided into smoking and non-smoking women. Milk samples in each groups were taken during the first week of lactation, they were collected into 5 ml sterile polypropylene containers by manual expression, always in the morning hours between 10 am and 11 am. Samples were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and analyses were done after all samples had been collected. Mercury contents were determined by the cold vapor atomic absorption spectrometry (CV-AAS). The instrument used was MA-2 spectrophotometer. The sample was thermally decomposed, further mercury was atomized and free mercury vapour in the generated gas was collected by collecting agent (gold-coated diatomite particle support) in the form of gold amalgam. The mercury collection agent was then heated to release atomic mercury. The mercury was detected using cold vapour atomic absorption method at a wavelength of 253.7 nm. To remove any substances that could interfere with measurement two kinds of additives were used: activated alumina and sodium carbonate with calcium hydroxide. The concentration of the mercury was expressed in micrograms per one liter of the milk. Statistical analysis of mercury was performed using one-way ANOVA, followed by Levene's test.

## RESULTS

Infants drinking breast milk are exposed to a neurotoxic influence of mercury. Sixty milk samples were analyzed for total mercury content. The contents of mercury in all samples were within the range from 1.05 to  $3.73 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (median:  $1.99 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). First group consist of 36 women in age of 25-30 years old, there were 18 non-smoking mothers were the total mercury level range from  $1.30\text{-}2.58 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (mean  $1.78\pm 0.41 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and 18 smoking mothers were the total mercury content was between  $1.05\text{-}3.73 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (mean  $2.30\pm 0.88 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Fig.1).

The second group of age 31-38 years consists of 24 women. Eighteen of them were non-smoking women with the total mercury concentration in range  $1.26\text{-}2.40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (mean  $1.92\pm 0.34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Fig.2). Eight women from second group were smokers with mercury content between  $1.11\text{-}2.64 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $1.97\pm 0.44 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

After comparing smoking and non-smoking mothers (25-30 years), significant differences were found in concentrations of mercury ( $p=0.00034$ ). However, differences in mercury levels between non-smoking and smoking women (31-38) were no statistically significant ( $p=0.89$ ). Likely, there were no statistically significant differences in Hg levels between young (25-30) and older (31-38) smoking women as well as between young and older non-smoking women.

In addition we compared the total mercury level between non-smoking and smoking women skipping their age. The results showed that mean mercury value in milk samples from non-smoking mothers was  $1.85\pm 0.38 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  whereas milk from smoking mothers contained  $2.14\pm 0.78 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig.3). Statistic analysis showed statistically

significant differences between non-smoking and smoking women ( $p=0.004$ ).

## DISCUSSION

In our study we have found that mercury is presented in all milk samples what points that breast milk can be the source of mercury contamination for newborn infants. Literature indicates various sources of the mercury contamination of breast milk such as: place of living, dietary habits and number of amalgam fillings.

Our study demonstrate that the total mercury levels range from 1.05 to 3.73  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (median: 1.99  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) which are comparable to results of other studies (**Hopkinson et al., 1992**; **Drexler and Schaller, 1998**; **Dorea, 2004**, **Bose-O'Reilly et al., 2008**).

**Bose-O'Reilly et al. (2008)** presented that mercury values fluctuated between 6.86-8,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , in some cases reached extremely high level 149  $\mu\text{g.L}^{-1}$  similar concentrations are showed by **Barbosa and Dorea, (1998)**. The results of both studies are explained by the fact of living near gold mining areas. From the other side, some authors reported concentrations of total mercury positively associated with the diet rich in fish, for example **Chien et al. (2006)** – 0.24-9.45  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , **Drexler et al. (1998)** 11-20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and **Barbosa and Dorea, (1998)** at al. who demonstrated mean mercury concentration in milk from different countries-Spain 9.5  $\text{ng.ml}^{-1}$ , Italy even 13  $\text{ng/ml}$  (**Barbosa and Dorea, 1998**). Dental amalgam fillings as third source of Hg contamination in milk are disputable issue. Some authors, like **Oskarsson et al., (1996)**, **Drasch et al. (1998)** and **Pizzichini et al. (2003)** found that amalgam fillings could be the main source of Hg contamination both breast milk and mothers' blood. Contrary to this data, **Drexler et al. (1998)** suggested that correlation between amalgam fillings and mercury level in milk is uncertain.

Subjects in our study were recruited from among lactating women who lived in Cracow in southern Poland. In this region there are no huge mining areas which can have influence on mercury contamination. Fish consumption in Poland is low (6.76 kg/year) and also low mercury concentration is in market fish (65  $\mu\text{g/kg}$ ). According to **Nabrzyski et al. (1984)** only 7% of the dietary intake derived from fish. Contrary, the average consumption per capita by the 28 countries is about 22 kg/caput/year. Because of that, it seems that this two factors cannot be taking into account as the major sources of the mercury contamination of breast milk of our studies.

Significant differences between milk samples from smoking (2.14  $\mu\text{gHg/L}$ ) and non-smoking women (1.85  $\mu\text{gHg/L}$ ) suggest that cigarettes could be the essential source of Hg pollution in milk. There is lack of data in the literature which determine mercury in smoking and non-smoking mother, only **Gundacker et al. (2002)** pointed that smoking has no influence on the milk mercury contents. On the other hand there was observed a poor correlation between smoking and Hg levels in blood and urine, from the chloralkali workers (**Langworth et al., 1991**).

Moreover, insignificant differences in Hg levels between young (25-30) and older (31-38) smoking women as well between young and older non-smoking women suggested that age is not important factor. Similarly, **Chien et al. (2006)** observed that breast milk mercury concentration

increase with age, though the increase did not reach statistical significance. There are very few studies which examine mercury level in human organism in relation with age, for example **Gundacker et al. (2006)** showed that mercury concentrations in blood did not depend on women' age.

Breast milk contaminated with Hg is essential exposure to a neuro-toxic substance for new born infants. Daily intake of mercury exposure for adults recommended by **WHO/FAO (1989)** equals 0.5  $\mu\text{g/kg}$  of body weight. Literature shows various estimations of daily mercury intake for infants and children in different age. Calculated daily mercury intake range from 0.64  $\mu\text{g/kg}$  body weight (**Barbosa and Dorea, 1998**) to 0.3  $\text{g/kg}$  body weight/day (**Oskarsson et al. 1996**). In Poland, the average daily dietary intake of mercury was 5.08  $\mu\text{g/day}$  and in the age group 1-6 years, 5.43  $\mu\text{g/day}$  (**Szprengier-Juszkiewicz, 1988**). For comparative purposes we estimated daily intake of mercury for infants at 1 month, which amount to 0.17 $\mu\text{g/kg}$  body weight. This level of exposure is minor to the mercury dose recommended by WHO/FAO for adults.

## CONCLUSIONS

Human milk may be the source of mercury exposure, what can have neuro-toxic influence of development of the newborn baby. Based on our study it seems that cigarette smoking is one of the essential sources of mercury contamination. However, our results do not exceed recommended daily intakes and they are lower than other study. We suggested that further analysis of smoking influence on Hg concentration in human milk and its properties should be performed.

## REFERENCE

- BARBOSA, A. C., DOREA, J. G. 1998. Indices of mercury contamination during breast feeding in the Amazon Basin. In *Environmental Toxicology and Pharmacology*, roč.6, 1998, č. 2, s. 71-79.
- BJÖRNBERG, K. A., VAHTER, M., BERGLUND, B., NIKLASSON, B., BLENNOW, M., SANDBORGH-ENGLUND, G. 2005. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-feed infant. In *Environ Health Perspect.*, roč. 113, 2005, č. 10, s. 1381–1385.
- BOSE-O'REILLY, S., LETTMEIER, B., ROIDER, G., SIEBERT, U., DRASCH, G. 2008. Mercury in breast milk-health hazard for infants in gold mining areas. In *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, roč. 211, 2008, č. 5-6, s. 615-623.
- CHIEN, L. C., HAN, B. C., HSU, C. S., JIANG, C. B., YOU, H. J., SHIEH, M. J., YEH, C. Y. 2006. Analysis of the health risk of exposure to breast milk mercury in infants in Taiwan. In *Chemosphere*, roč. 64, 2006, č. 1, s.79-85.
- DOREA, J. G. 2004. Mercury and lead during breast-feeding. In *The British Journal of Nutrition*, roč. 92, 2004, č. 1, s 21-40.
- DRASCH, G., AIGNER, S., ROIDER, G., STAIGER, F., LIPOWSKY, G. 1998. Mercury in human colostrum and early breast milk. Its dependence on dental amalgam and other factors. In *J. Trace Elem. Med. Biol.* roč. 12, 1998, č.1, s. 23-27.
- DREXLER, H., SCHALLER, K. H. 1998. The mercury concentration in breast milk resulting from amalgam fillings

and dietary habits. In *Environmental Research*, roč. 77, 1998, č.2, s. 124-129,

DŽUGAN, M., JUSZCZYK, M. 2000. Rakotvórcze substancje w dymie tytoniowym. In *Zdrowie Publiczne*, roč. 116, 2000, č. 4, s. 627-630.

GRAEME, K. A., POLLACK, CH. V. 1998. Heavy metals toxicity part I: arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine*, roč. 16, 1998, č. 1, s. 45-56

GUNDAKER, C., KOMARNICKI, G., ZÖDL, B., FORSTER, CH., SCHUSTER, E., WITTMANN, K. 2006. Whole blood mercury and selenium concentrations in a selected Austrian population: Does gender matter? In: *Science of The Total Environment*, roč. 372, 2006, 1, s. 76-86.

GUNDAKER, C., PIETSCHING, B., WITTMANN, K. J., LISCHKA, A. SALZER, H., HOHENAUER, L., SCHUSTER, E. 2002. Lead and mercury in breast milk. In *Pediatrics*, roč. 110, 2002, č. 5, s. 873-878.

HOPKINSON, J. M., SCHANLER, R. J., KENNARD FRALEY, J., GARZA, C. 1992. Milk Production by Mothers of Premature Infants: Influence of Cigarette Smoking. In *Pediatrics*, roč. 90, 1992, č. 6, s. 934-938

LANGWORTH, S., ELINDER, C. G., GÖTHE, C. J., VESTERBER, O. 1991. Biological monitoring of environmental and occupational exposure to mercury. In *International Archives of Occupational and Environmental Health*, roč. 63, 1991, č. 3, s. 161-167.

NABRZYSKI, M., GAJEWSKA, R. 1984. Determination of mercury, cadmium, and lead in food. In *Rocz. PZH*, roč. 35, 1984, č. 1, s.1-11.

OSKARSSON, A. A., SKERFVING, S., HALLÉN, I.P., OHLIN, B., LAGERKVIST, B.J. 1996. Total and Inorganic Mercury in Breast Milk and Blood in Relation to Fish Consumption and Amalgam Fillings in Lactating Women. In *Archives of Environmental Health*, roč. 51, 1996, č. 3, s. 234-241

PANTA, Y. M., QIAN, S., CROSS, CH. L., CIZDZIEL, J. V. 2008. Mercury content of whole cigarettes, cigars and chewing tobacco packets using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. In *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, roč. 83, 2008, č. 1, s.7-11

PIZZICHINI, M., FONZI, M., GIANNERINI, F., MENCARELLI, M., GASPARONI, A., ROCCHI, G., KAITASAS, V., FONZI, L. 2003. Influence of amalgam fillings on Hg levels and total antioxidant activity in plasma of health donors. In *The Science of The Total Environment*, roč. 301, 2003, č. 1-3, s. 43-50.

SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T. 1988. Evaluation of daily intake of mercury with food stuffs in Poland. In *Bromatol. Chem. Toksykol.*, roč. 21, 1998, s. 228-232.

VALAVANIDIS. A., VLACHOGIANNI, T., FIOTAKIS, K. 2009. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. In *Int J Environ Res Public Health*, roč. 6, 2009, č.2, s. 445-462.

VIO, F., SALAZAR, G., INFANTE, C. 1991. Smoking during pregnancy and lactation and its effects on breast-milk volume. In *American Journal of Clinical Nutrition*, roč. 54, 1991, č. 4 s. 1011-1016.

WHO 1989, Minor and trace elements in human milk; Report of a Joint WHO/IEAE Collaborative study, WHO, Geneva, s. 64.

### Contact address:

Mgr. Katarzyna Kilian, Mgr. Zofia Goc, Dr. Grzegorz Formicki, PhD., doc. Dr. Robert Stawarz, PhD. Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej  
31-054 Kraków, ul. Podbrzezie 3, Poland, e-mail: kasiakk66@interia.pl

## VPLYV TOXICKÝCH KOVOV NA IMUNITNÝ SYSTÉM

### EFFECT OF TOXIC METALS TO THE IMMUNE SYSTEMS

*Norbert Lukáč, Peter Massányi, Marcela Capcarová, Jaroslav Kováčik, Monika Martiniaková,*

#### ABSTRACT

Concern about the effects of environmental contaminants on immune function in both humans and wildlife is growing and practically nothing is known about this impact on immune systems. Immunotoxicity is an important health hazard of heavy metal exposure. The present understanding of the effect of metals (including ions and their compounds) on the immune system has evolved recently. These effects include suppression, unspecific stimulation, hypersensitivity, and autoimmunity. Many metals show a paradoxical dose-response relationship with stimulation of certain immune functions at low doses and suppression at high doses. The global immune function is often preserved because of the redundancy and the reserve capacity of the immune system, and clinically relevant effects are uncommon.

**Keywords:** immunity, toxic metals, immunosupresion

#### ÚVOD

Štúdiu vplyvu cudzorodých látok vonkajšieho prostredia na organizmus ľudí a zvierat je v ostatnom období venovaná veľká pozornosť. Je to hlavne z dôvodov vysokej kontaminácie životného prostredia chemickými látkami používanými v priemysle i v poľnohospodárstve a ich účinku na zdravotný stav ľudskej a zvieracej populácie. V súčasnosti zaznamenávame stále stúpajúci počet chemických látok rôzneho charakteru a pôvodu, ako sú agrochemikálie, potravinové aditíva, liečivá a rôzne priemyselné reagenty. Tieto látky sa prirodzenými alebo umelými cestami dostávajú do životného prostredia, čím

dochádza ku kontaminácii potravinového reťazca a k zvyšovaniu zaťaženia populácie ľudí a zvierat chemickými látkami.

Hlavným dôsledkom negatívneho pôsobenia environmentálnych cudzorodých látok je narušenie optimálnej imunitnej reaktivity organizmu, výskyt alergií, zvýšená vnímavosť na patogénne agensy, vyšší výskyt nádorov, ovplyvnenie reprodukcie. Pri hodnotení účinku cudzorodých látok treba brať do úvahy skutočnosť, že u mnohých z nich sa uplatňuje kumulatívny efekt, t.j. ich negatívny účinok na imunitný systém sa prejaví až po dlhšej dobe ich pôsobenia, keď kumulované množstvo

danej látky dosiahne určitú koncentráciu. Do tejto doby negatívne účinky na imunitné funkcie obvykle nie sú pozorované, dokonca paradoxne môže dôjsť k prechodnému zvýšeniu aktivity imunitného systému. Tento účinok bol zaznamenaný pri ťažkých kovoch, polychlorovaných bifenyloch a pesticídoch. Z ďalších významných faktorov ovplyvňujúcich pôsobenie cudzorodých látok na živý organizmus je možný kombinovaný účinok, resp. synergické pôsobenie viacerých druhov chemických látok, vplyv environmentálnych faktorov a v neposlednej rade aj aktuálny stav vnútorného prostredia a imunokompetencie organizmu.

Toxicita kovov je známa už niekoľko storočí. V prípade kovov sú stanovené v legislatíve prípustné koncentrácie v ovzduší, vode aj požívatinách. Aj tu platí v plnom rozsahu "Bertrandov zákon" - *všetky prvky sú toxické, ak sú prijímané v dostatočne vysokej dávke a po dostatočne dlhú dobu (Dhar, 1962).*

**Beneš (1988)** udáva, že zdroje ťažkých kovov môžu byť:

- Prirodzené (zvetrávanie hornín, pevný spád, atmosférické zrážky),
- Antropogénne
  1. priame (úmyselná aplikácia) morenie osív, ochrana kultúr a pod.
  2. nepriame (neúmyselná aplikácia) energetický priemysel, hutnícky, chemický, doprava a pod..

Určité kovy sú pre normálnu funkciu organizmu potrebné. Obyčajne sú súčasťou enzýmov, a plnia rôzne úlohy pri metabolických pochodoch a v prenose elektrónov. Takéto sú Mn, Cu, Co, Ni, Mo, Fe a Zn. Vo vyšších koncentráciách ale už môžu byť toxické. Najnebezpečnejšie ťažké kovy, As, Hg, Pb a Cd v organizme nemajú takmer žiadny funkčný význam.

Podľa údajov **Ništiar (2006)** ťažké kovy predstavujú jednu z najnebezpečnejších skupín škodlivín, nakoľko:

- ťažké kovy sa nedegradujú počas prírodných procesov,
- pôsobením minerálnych a biologických procesov sa hromadia (geo-, bio- a ekoakumulácia),
- priamo alebo cez potravinové reťazce spôsobujú akútne alebo chronické intoxikácie ľudí a zvierat.

Ťažké kovy účinkujú dlhodobo, vyvolávajú obyčajne chronické poškodenia podprahovými dávkami. Následkom rôznych stravovacích zvyklostí je u človeka veľmi ťažké posúdiť záťaž (background, pozadie) z ťažkých kovov. Väčšina ťažkých kovov sa dostáva do organizmu vegetabilnou alebo živočíšnou potravou, oproti tomu, je záťaž z ovzdušia, resp. pitnej vody podstatne nižšia.

### Berýlium

Indukuje rôzne ochorenia ako granulomatóza pľúc a kožné zmeny. Tieto granulomatózne reakcie vznikajú ako odpoveď T-lymfocytov na soli berýlia. **Pistl et al. (2004)** uvádza, že je pravdepodobné, že existuje určitá genetická predispozícia nakoľko väčšina pacientov s berýliovým pľúcny ochorením má zvláštnu HLA-DP alelu. Vývoj pľúcnych a kožných granulómov závisí od prítomnosti buniek obsahujúcich antigén, pamäťových T-lymfocytov

a uvoľnení zápalových citokínov makrofágmi a lymfocytmi.

Najväčšie zdravotné riziko pre organizmus ale predstavuje príjem berylnatých solí v potrave alebo pitnej vode. Zvýšený príjem solí berýlia dokázateľne spôsobuje veľké riziko vzniku rakovinového nádoru. Z tohto dôvodu je berýlium považované za jeden z veľmi vážnych rizikových faktorov a jeho výskyt v pitnej vode a potravinách je neustále monitorovaný, pričom povolené limity koncentrácie patria k najnižším z bežne sledovaných prvkov (**Pfeifer et al., 1994**).

### Kadmium (Cd)

Kadmium zaraďujeme medzi prudko jedovaté kovy. Je dôležité poukázať na fakt, že Cd sa z ovzdušia suchou alebo mokrou depozíciou dostáva do pôd, odtiaľ sa vstrebáva do rastlín a následne vstupuje do potravinového reťazca, pričom rýchlosť prestupu závisí od typu pôdy, druhu rastlín, pH, meteorologických podmienok, aplikovania hnojív, atď. Je zložkou exhalátov energetického priemyslu, naftových motorov a spaľovania odpadov. Nachádza sa i v cigaretovom dyme. Vyfajčenie 20 cigariet denne vedie k vdýchnutiu 1-10 mg Cd. Cd patrí medzi časté príčiny karcinómu pľúc fajčiarov. Referenčná dávka (RfD) pre príjem Cd v potravinách je 0,001 mg/kg/deň (vo vode polovica). Obsah Cd v požívatinách sa pohybuje okolo 0,5-1,0 mg.kg<sup>-1</sup>. Už 15 mg.kg<sup>-1</sup> má toxikologický význam. Je najzávažnejším kontaminantom potravín s pomedzi ťažkých kovov u nás (najviac na Východnom Slovensku) **Ništiar (2006)**.

V organizme sa kadmium viaže na niektoré enzýmy a blokuje ich činnosť. Kumuluje sa v obličkách. Zvýšeným príjmom Cd sa podmieňuje riziko srdcovo-cievnych ochorení, anémie a kardiomyopatie. Kadmium sa usadzuje v obličkách a artériách, spôsobuje vysoký krvný tlak, arteriosklerózu, mozgové krvácanie a infarkt. Neutralizuje antioxidantné systémy ako sú Zn a vitamín C, ako aj Ca a Cu. Chronická otrava Cd sa často objavuje až po 5 až 10 rokoch, často až po 30 rokoch. Cd postupne deštruuje kostnú dreň, počet erytrocytov klesá na hodnoty 10% pôvodných, vápnik sa uvoľňuje z kostí.

Pri krátkodobej i dlhodobej expozícii kadmium sa znižuje imunita sprostredkovaná bunkami, fagocytóza a aktivita NK – buniek (**Pistl et al., 2004**). **Lu et al. (2000)** poukázali na význam beta-adrenoreceptorov v mechanizme imunotoxickosti kadmia. Účinok kadmia na humorálnu imunitu zvierat nebol presne stanovený, nakoľko sa výsledky jednotlivých experimentov od seba líšili (**Descotes et al., 1990; Satoh et al., 2003; Nad' et al., 2003**).

### Olovo

Olovo je vysoko toxický prvok, zložkou exhalátov, najmä metalurgického priemyslu a tiež z cigaretového dymu (1 mg Pb z jednej cigarety). Prirodzený obsah olova je vo väčšine rastlinných produktov 0,05 až 0,3 mg.100<sup>-1</sup> g. Maximálne denné zaťaženie olovom je u človeka okolo 0,005 mg.kg<sup>-1</sup>. V organizme človeka je okolo 100-400 mg a vekom jeho množstvo stúpa. V krvi sa absorbuje net aloidy bielkovín, najmä na červené krvinky a nimi sa

dostáva do orgánov. Usadzuje sa v pečeni, obličkách, mozgu, slezine, kostiach a zuboch. Je pre človeka toxický, preniká membránami všetkých buniek a hromadí sa v kostiach, pečeni, slezine, obličkách, mozgu a zuboch. Pri dlhotrvajúcej expozícii môže vzniknúť normocytová alebo mikrocytová anémia mierneho stupňa. V krvi sa zjavia bazofilné bodkované erytrocyty a retikulyocyty (Ništiar, 2006). Je málo konkrétnych údajov vplyvu olova na imunitný systém (McCabe, 1994). Pokiaľ sú štúdie ohľadom účinku olova na imunitný systém výrazne sa rozchádzajú v študovaných materiáloch a využitých metódach, takže výsledky sú nejednotné a ťažko reprodukovateľné resp. využiteľné na iné živočíšne druhy. Experimentálne práce (Lawrence, 1985; Descotes et al., 1990; Koller, 1990) dokázali imunosupresívny účinok olova. Na zvýšenie vnímavosť k infekčným ochoreniam potvrdzuje aj McCabe (1994). Olovo podľa Blackey et al. (1982), Exona et al., (1985) ovplyvňuje aktivitu IL-2 no neinhibuje interferón. Väčšina štúdií dokázala výrazný imunotoxický účinok olova. Pracujúci v závodoch na spracovanie olova majú narušenú humorálnu imunitu, konkrétne zmeny v koncentrácii imunoglobulínov v krvnom sére (Undeger et al., 1996; Pinkerton et al., 1998) a v slinách (Queiroz et al., 1994; Pinkerton et al., 1998). Podľa Talcotta et al. (1985) nie je ovplyvnená aktivita NK-buniek vplyvom olova. Variabilita výsledkov získaných pri experimentálnych štúdiách s olovom u zvierat je pripisovaná druhovým a kmeňovým odlišnostiam.

### Ortuť

Do organizmu sa dostáva prostredníctvom požívatin živočíšneho (najmä ryby) a rastlinného pôvodu a vodou. Je bežnou zložkou fungicídov, pesticídov. Je po Cd druhým najzávažnejším kontaminantom požívatin u nás. Vo vode je obsah Hg omnoho vyšší ako v ovzduší. Napriek tomu, že v pôde a vode sa rýchlo usadzuje a nastáva geoakumulácia, vo vodných organizmoch môže dôjsť k eko- resp. bioakumulácii. Mikroorganizmy Hg konvertujú do veľmi toxickéj kovovej zlúčeniny metylortuti ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ , 50-krát jedovatejšia ako Hg), ktorý už v nízkych koncentráciách je silne toxický. V tejto forme ho organizmy dobre prijímajú a kumulujú. Metylortuť sa kumuluje v organizme morských živočíchov a preto musí byť stále monitorovaná kontaminácia rýb (30-1000 násobne vyššia koncentrácia ako vo vode). Ovplyvnenie funkcie imunitného systému metylortuťou opísali viacerí autori. Najvyššia prípustná koncentrácia Hg v potravinách je  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  v pitnej vode  $0,001 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Aplikácie soli ortute mali za následok zníženie humorálnej a bunkami sprostredkovanej imunity ako aj nešpecifickej obrany pokusných zvierat (Pistl et al., 2004). Laschi-loquerie et al. (1987) zaznamenali pokles humorálnej imunity myši po perorálnej expozícii metylortuti v dávke 0,5, 2 a  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  v pitnej vode po dobu 3 týždňov. Holloway et al. (2003) udávajú že expozícia metylortute u vtákov ovplyvňuje fagocytózu. Ortuť a v menšom rozsahu olovo indukujú polyklónovú aktiváciu B-lymfocytov, čo môže súvisieť s vývojom autoimunity (Pistl et al., 2004).

### Nikel

V súčasnosti je 10-15% ľudskej populácie alergickej na nikel. Po kontakte s predmetmi obsahujúcimi tento kov (gombíky, rámy okuliarov, mince, nožnice a pod.) sa môže vyvinúť kontaktná alergická dermatitída. Niektorí citliví ľudia reagujú na nikel prítomný vo vode, vzduchu, tabakovom dyme, čistiaciach prostriedkoch, zelenine, ovocí, čokoláde a tukoch (Bordignon et al., 2008). Po inhalačnej expozícii vysokými dávkami niklu sa u pracovníkov metalurgického priemyslu vyskytuje chronická bronchitída, nádory pľúc a nosovej dutiny (Fujita et al., 2009). Je dokázaná vrodená imunitná odpoveď na nikel prostredníctvom NK buniek a NKG2D receptora (Kim et al., 2009)

### Zmesi ťažkých kovov

Ťažké kovy ako olovo, kadmium, ortuť, nikel vyvolávajú účinky v rozsahu od imunosupresie až po stimuláciu imunitnej odpovede (Pistl et al., 2004). Pri experimentálnom skrmovaní zmesi emisii z priemyselného závodu na výrobu medi a zinku (Cu, Fe, Zn, Mo, Se, As, Cd a Pb) zaznamenali Bíreš et al. (1990) zmeny fagocytárnej aktivity leukocytov, hladiny plazmového Ig a albumínu u pokusných oviec. Testovali účinok perorálnej 15 dennej aplikácie emisii ťažkých kovov na bunky imunitného systému oviec. 2 mg emisie predstavovalo dávku z trávneho porastu 2 km od závodu na výrobu medi. U pokusných zvierat imunizovaných vakcínou proti *L. monocytogenes* bolo zaznamenané signifikantné zníženie indexu metabolického vzplanutia fagocytov a zníženie odpovede lymfocytov na mitogénny a antigénny podnet. Zmes olova, niklu a selénu sa v prirodzených podmienkach vyskytuje zriedka no na protilátkovú odpoveď a fagocytózu má výrazný inhibičný efekt. *In vitro* vplyv ťažkých kovov primárne postihuje humorálnu imunitu. Je známy aj imunopotetný účinok iontov olova a niklu na indukciu proliferácie lymfocytov. Kadmium a olovo sú ťažké kovy u ktorých sa najčastejšie zaznamenáva poškodenie funkcie T- a B- lymfocytov a makrofágov.

### ZÁVER

Vnímovosť imunitného systému na cudzorodé látky, pôsobením ktorých dochádza k imunosupresii, závisí od vlastností chemickej látky, ako aj od komplexnej povahy imunitného systému. Toxické ťažké kovy môžu spôsobiť zmeny vo funkcii imunitného systému nasledovnými spôsobmi:

- ✓ evokovať interakciu xenobiotika s bunkami imunitného systému,
- ✓ toxická látka ovplyvňuje aktivitu lymfocytov,
- ✓ potencionálny toxický efekt, môže ovplyvňovať proliferáciu a diferenciaciu lymfocytov.

Vzhľadom k tomu, že čistota životného prostredia a negatívny vplyv jeho kontaminácie na zdravie ľudí a zvierat predstavuje v súčasnosti vysoko aktuálny problém je potrebné prehlbovať si získané poznatky o vplyve xenobiotík na živý organizmus, a tak zabrániť ich možným škodlivým účinkom.



LITERATÚRA

- BENEŠ, S. 1988. Využitelnost elektrárenských popílků v zemědělské výrobě. In *Význam a využití stopových prvků v rostlinnej a živočišnej výrobe*. Nitra: SPU, 1988, s. 71-75.
- BÍREŠ, J., VRZGULOVÁ, L., HOJEROVA A. 1990. Zmeny fagocytárnej aktivity krvných leukocytov, hladiny plazmových Ig a albumínu u oviec po skrmovaní emisného substrátu. In *Živočišna výroba*, roč. 35, 1990, č. 4, s. 763 – 771.
- BLACKLEY, B. R., ARCHER, D. L., OSBORNE, I. 1982. The effect of lead on immune and viral interferon production. In *Can. J. Comp. Med.*, roč. 46, 1982, č. 2, s. 43-46.
- BORDIGNON, V., PALAMARA F., CORDIALI-FEI, P., VENTO, A., AIELLO, A., PICARDO, M., ENSOLI, F., CRISTAUDO, A. 2008. Nickel, palladium and rhodium induced IFN-gamma and IL-10 production as assessed by *in vitro* ELISpot-analysis in contact dermatitis patients. In *Immunol.*, roč. 15, 2008, č. 9, s. 19-22.
- DESCOTES, J. 1990. Drug – induced immune diseases. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1990, 320 s.
- DESCOTES, J. 1990. Immunotoxicology of drugs and chemicals. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1990, 444 s.
- DHAR, N. R. 1962. Prof. Gabriel Bertrand, In *Nature*, roč. 196, 1962, č. 2, s. 16 – 17.
- EXON, J. R. 1985. Effect of lead, polychlorinated biphenyls and cyclophosphamide on rat natural killer cells, interleukin 2, and antibody synthesis. In *Fundam. Appl. Toxicol.*, roč. 5, 1985, č. 1, s. 158-164.
- FUJITA, K., MORIMOTO, Y., OGAMI, A., MYOJYO, T., TANAKA, I., SHIMADA, M., WANG, W. N., ENDOH, S., UCHIDA, K., NAKAZATO, T., YAMAMOTO, K., FUKUI, H., HORIE, M., YOSHIDA, Y., IWAHASHI, H., NAKANISHI, J. 2009. Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C60 fullerene particles. In *Toxicology*, roč. 258, 2009, č. 5, s. 47-55.
- HOLLOWAY, J., SCHEUHAMMER, A. M., CHAN, H. M. 2003. Assessment of white blood cell phagocytosis as an immunological indicator of methylmercury exposure in birds. In *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, roč. 44, 2003, č.4, s. 493-501.
- KIM, J. Y., HUH, K., LEE, K. Y., YANG, J. M., KIM, T. J. 2009. Nickel induces secretion of ifn-gamma by splenic natural killer cells. In *Exp. Mol. Med.*, roč. 4, 2009, č. 30, s. 288-295.
- KOLLER, L. D. 1990. The immunotoxic effects of lead in lead-exposed laboratory animals. In *Ann. NY Acad. Sci.*, roč. 587, 1990, č. 5, s. 160-167.
- LASCHI-LOQUERIE, A., EYRAUD, A., MORISSET, D., SANOU, A., TACHON, P., VEYSSEYRE, C., DESCOTES, J. 1987. Influence of Heavy Metals on the Resistance of Mice Toward Infection. In *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, vol. 9, 1987, č. 2, s. 235-241.
- LAWRENCE, D. A. 1985. Immunotoxicology. and immunopharmacology. New York, Raven Press, 1985, 341 s.
- LU, C., LI, D., DONG, S., LIN, Z., CHEN, C., YU, G. 2000. Study on beta-adrenoreceptors mechanism of cadmium immunotoxicity. In *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, roč. 34, 2000, č. 3, s. 140 – 143.
- MCCABE, M. J. 1994. Mechanisms and consequences of immunomodulation by lead. In : DEAN, J. H., LUSTER, M. I., MUNSON, A. E., KIMBER, I. : Immunotoxicity and immunopharmacology, 2.ed., New York, Raven Press, 1994, 143- 162.
- NAĎ, P., SKALICKÁ, M., KORENEKOVÁ, B., ĎATELINKA, I., MARŠÁLKOVÁ, S., HERICH, R., KORENEK, M. 2003. Účinok kadmia v interakcii so zinkom na vybrané parametre imunitného systému u hydiny. In: *Zborník referátov XII. Vedeckého sympózia, Hrádok 2003*, s. 235 – 238.
- NIŠTIAR, F. 2006. Úvod do imunopatológie , <http://www.patfyz.medic.upjs.sk/>
- PFEIFER, S., BARTLETT, R., STRAUSS, J., HALLER, S., MÜLLER-QUERNHEIM, J. Beryllium-induced disturbances of the murine immune system reflect some phenomena observed in sarcoidosis. In *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, roč. 104, 1994, č.4, s. 332-339.
- PINKERTON, L. E., BIAGINI, R. E., WARD, E. M., HULL, R. L., DEDDENS, J. A., BOENIGER, M. F., SCHNORR, T. M., MACKENZIE, B. A., LUSTER, M. I. 1998. Immunologic findings among lead-exposed workers American. In *Journal of Industrial Medicine*, roč. 33, 1998, č. 4, s. 400 – 408.
- PISTL, J., KOVALKOVIČOVÁ, N., LEGÁTH, J., MIKULA, I., HOLOVSKÁ, V. 2004. Imunotoxikológia vo veterinárnej medicíne . UVL , Košice, 2004 ,155 s.
- QUEIROZ, M. L. S., FERNANDEZ, M. D., VALADARES, M. C. 1999. Neutrophil function in workers exposed to organophosphate and carbamate insecticides .In *Int. J. Immunopharm.*, roč. 21, 1999, č. 4, s. 263-270.
- SATO, M., KAJI, T., TOHYAMA, C. 2003. Low dose exposure to cadmium and its health effects. Toxicity in laboratory animals and cultured cells. In *Environ. Health Perspect*, roč. 111, 2003, č. 4, s. 579-583.
- TALCOTT, P. A., KOLLER, L. D., EXON, J. H. 1985. The effect of lead and polychlorinated biphenyl exposure on rat natural killer cell cytotoxicity. In *Int. J. Immunopharmacol.*, roč. 7, 1985, č. 3, s. 255 -261.
- UNDEGER, U., BAŞARAN, N., CANPINAR, H., KANSU, E. 1996. Immune alterations in lead-exposed workers. In *Toxicology*. roč. 109, 1996, č. 2-3, s. 167-72.

**Pod'akovanie:**

Práca bola podporená projektom MŠ SR VEGA 1/0696/08 a KEGA 3/7338/09.

**Kontaktná adresa:**

doc. Ing. Norbert Lukáč, PhD. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KFŽ, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 6414349, E-mail: norolukac@gmail.com

**ANIMÁLNE MODELY V KARDIOLÓGII Z POHLĀDU KARDIOCHIRURGA****ANIMAL MODELS IN CARDIOLOGY FROM THE VIEW OF HEART SURGEON**

Štefan Lukačín, Agnesa Lukačínová

**ABSTRACT**

The use of animal models to study cardiovascular disease has made a substantial contribution to increasing our understanding of disease pathogenesis, has led to the development of diagnostic techniques, and has made it possible to verify the effectiveness of different preventative and therapeutic approaches, whether pharmacological or interventional. The main limitations stem from differences between human and experimentally induced pathology, in terms of both genetic regulatory mechanisms and factors that influence cardiovascular function. The experimental models and preparations used in cardiovascular research include those based on isolated cells or tissues or structures immersed in organ baths. In small mammals, a number of models have been developed of cardiovascular conditions that result from spontaneous genetic mutations or, alternatively, that may be induced by specific genomic modification. One of the techniques employed is gene transfer, which can involve the controlled induction of mutations that result in the expression of abnormalities associated with the development of a broad range of different types of cardiovascular disease. Larger animals are used in experimental models in which it is important that physiological regulatory and homeostatic mechanisms are present.

**Keywords:** animal models, heart surgery, biomedical research, ethics of animal experiment

**ÚVOD**

Kardiovaskulárne ochorenia sú najčastejšou príčinou smrti v modernom svete (Mozaffarian et al. 2008). Sú bežne sa vyskytujúcou finálnou komplikáciou mnohých ochorení a preto sa vyznačujú výraznou multifaktorovosťou a polygénovým charakterom (Bassuk a Manson, 2008). Sú komplexom porúch následkom životného štýlu a genetickej predispozície. Za dva najvšeobecnejšie patogenetické príčiny sú považované poruchy lipidového metabolizmu a metabolický syndróm (Retelny et al. 2008). V podstate ide o komplex procesov následkom oxidatívneho stresu a jeho dopadov. Vznikajúce reaktívne formy kyslíka poškodzujú tak gény, ako aj ostatné bioaktívne molekuly organizmu, najmä proteíny a lipidy, čo vedie k poškodeniu biologických membrán a procesov regulácie všetkých dráh metabolizmu a signálnej transdukcie. Z hľadiska kardiovaskulárneho systému ide najmä o urýchlenie procesov aterosklerózy. Vývoj nových a vylepšených postupov terapie a prevencie je založený na využívaní animálnych modelov, ktoré imitujú ľudské ochorenia. V tomto prehľade sa zameriame práve na tieto modely, ich využiteľnosť, opodstatnenosť a validitu pre kardiovaskulárne ochorenia z aspektu kardiochirurga. Ideálny animálny model kardiovaskulárnej choroby má napodobniť človeka po stránke metabolickej a patofyziologickej, má byť dostatočne veľký, aby umožnil fyziologické a metabolické štúdiá (v prípade kardiochirurgie intervenčné zákroky), a vo všetkých rozhodujúcich procesoch patogenézy bol veľmi podobný človeku. Na základe komplexnej multifaktorovej povahy kardiovaskulárnych chorôb, bude možné pre tento účel využiť viac druhov, ktoré viac-menej budú špecifické pre určité ochorenie alebo etapu rozvoja ochorenia. V tejto oblasti je potrebné sa sústrediť najmä na:

- Identifikáciu molekulových mechanizmov, úlohu alterácie génov v rozvoji kardiovaskulárnych ochorení (vyvolaných najmä vírusmi), farmakologickej intervencie (účinnosť liekov), diéty alebo ich kombinácie na modely experimentálneho zvierat'a.
- Vývoj nových metodík chirurgickej intervencie a invazívnych vyšetrovacích metodík, ich overenie a skvalitnenie z hľadiska bezpečnosti.

Využitie veľkých modelových zvierat, ktoré poskytujú práve pre potreby kardiochirurga najvhodnejší model (dobrá možnosť chirurgickej intervencie), sú pre ich cenu problémové. Podobne aj etické hľadisko je v prípade týchto modelov veľmi prísne a na druhej strane sú často nevhodné kvôli tomu, že z hľadiska patofyziológie neodrážajú uspokojivo finálny objekt – človeka. Spontánne mutácie u potkanov poskytujú rôzne modely pre štúdium obezity, hyperlipidémie, inzulínovej rezistencie a diabetes 2. typu, pri ktorých sa môžu vyvinúť kardiovaskulárne ochorenia a ischemické poškodenia. Myši podobne ako potkany sú obvyčajne rezistentné voči kardiovaskulárnym ochoreniam, aj keď u určitých kmeňov dochádza ku vzniku aterosklerózy po príjme cholesterolu, ale nevyústi to do ischemických lézií.

Vo výskumnej činnosti sú pokusné zvieratá bežne akceptované, ako náhrada za cieľový organizmus – človeka. Veľmi v širokom merítku sa využívajú na testovanie nových liekov, skrining a overovanie toxicity zlúčenín, štúdium procesov mutagenity a genotoxicity, štúdium patogenézy a prevencie rôznych ochorení. Aj keď sú často zdrojom veľmi cenných poznatkov, často môžu ale vyvolať aj nesprávne interpretácie určitých fenoménov, najmä pri nesprávnej voľbe modelového organizmu.

**ETICKÉ ASPEKTY ANIMÁLNYCH POKUSOV A TYPY MODELOV**

Uplynulo už viac ako 40 rokov od kedy Russell a Burch (1959) publikovali svoje pohľady na pokusy na zvieratách a predložili návrhy pre humánnejšie využívanie zvierat pre účely vedecké, testovacie a edukačné účely. Legislatívne opatrenia posledných dvoch dekád, najmä Nariadenie 86/609/EEC (*Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes*), zamerané na ochranu a reguláciu použitia laboratórnych zvierat pre vedecké ako aj edukačné účely upriamili pozornosť na využívanie alternatívnych metód (Worth a Balls, 2002). Otázne zostáva čo je možné účelne nahradiť, do akej miery je potreba nahradiť a v akej forme je možné nahradiť (Ništiar et al. 2006; 2009).

Ďalšia otázka, ktorá vyvoláva určitý problém v tejto oblasti je nejednotná interpretácia platnej legislatívy týkajúcej sa tejto oblasti (Zákon NR SR č. 488/2002 Z.z., a NV SR č. 23/2009 Z.z.). Uvedená legislatíva je dobrá,

len je potrebné si uvedomiť, že v žiadnom prípade nemá za cieľ „zakázať“ alebo „znemožniť“ využitie zvierat pre vedecké alebo pedagogické účely. Legislatíva nebola tvorená so zámerom likvidovať pokusy na zvieratách, ale na to, aby tieto boli riešené v určitom definovanom a kontrolovateľnom rámci a zodpovedali aj etickému duchu zákona a čo najviac sa približovali Európskym legislatívnym normám. Profesionálny a etický rozmer by mali posúdiť a schváliť príslušné etické komisie ustanovené v intenciách uvedených legislatívnych noriem, a schvaľujúci orgán (t.j. ŠVPS; Štátna veterinárna a potravinová správa). Kontrolu nad dodržaním pokusných podmienok vykonávajú tak príslušné etické komisie ako aj schvaľujúci orgán.

Osobitnú úlohu pri riešení tejto problematiky môže zohrať aj Slovenská spoločnosť pre vedu o laboratórnych zvieratách, ktorá by mala podchytiť čo najširšiu bázu odborníkov, vydávať metodické príručky týkajúce sa šetrného a racionálneho usporiadania a výkonu pokusov na zvieratách a možných alternatívnych metódach pre vedecký výskum alebo rutinnú expertízu (toxicitné testy a ich validácia, **Piersma, 2004**).

Treba ale povedať, že najlepšou ochranou zvierat zďaleka nie sú legislatívne opatrenia, ale dobré vedomosti o nich, o zaobchádzaní a starostlivosti o ne. A to je možné získať a vypestovať len pri bezprostrednom kontakte s nimi, v úzkej väzbe profesionálnych, etických, morálnych aj náboženských prístupov (**Capaldo, 2004**).

Najdôležitejším atribútom pred akýmkoľvek pokusom je potreba uvedomiť si päť základných „slobôd“ pokusných zvierat a pokiaľ to podmienky pokusu dovoľujú, a v maximálnej miere ich zohľadniť:

- Slobodný prístup k čerstvej vode (*ad libitum*).
- Slobodný prístup k primeranému množstvu vhodnej potravy (*ad libitum*).
- Nebyť vystavený bolesti a distresu.
- Nebyť vystavený úzkosti a strachu.
- Slobodne realizovať prirodzený spôsob chovania sa, napr. sexuálne správanie, starostlivosť o seba, získania potravy, úkrytu.

Veľmi dôležitým princípom je dôsledné dodržanie koncepcie troch R's (**Hendriksen et al. 2002**):

- *Reduction* – zníženie počtov používaných zvierat na minimálne potrebné.
- *Refinement* – eliminovať podľa možnosti z experimentálneho protokolu všetky bolestivé a diskomfortizačné činitele. Využívať anestéziu a analgéziu v maximálnej možnej miere.
- *Replacement* – pokiaľ sa dá nahradiť alternatívnymi postupmi, aspoň v tým častiach, kde nie je potrebné použitie bezprostredne zvierat'a (celého organizmu). Nepoužívať bez náležitého zváženia ihneď zvieratá pre pokus.

Už v Helsinskej Deklarácii Svetovej lekárskej asociácii z roku 1964 (odvtedy už revidovanej a doplnenej) pravidlo 12 hovorí, že „majú byť zabezpečené primerané podmienky, prostredie a starostlivosť o pokusné zvieratá zaradené do pokusu“. Ochrana a welfare zvierat (týka sa len stavovcov) používaných na pokusné účely je legislatívne upravená: *Council Directive 86/609/EEC*, *Directive 2003/65/EC*; *Council Decision 1999/575/EC* a *Council Decision 2003/584/EC*. Zatiaľ je značný rozdiel v spôsobe aplikácie týchto opatrení do vlastnej legislatívy.

23. januára 2006 Európska komisia upravila a predložila nový Akčný plán na zabezpečenie welfare zvierat v budúcnosti na podstatne vyššej úrovni vo všetkých členských krajinách Európskej únie.

Za náhradu sa považuje akákoľvek technika využívajúca necitlivý materiál, ktorý nahrádza použitie vnímavých živých stavovcov. Za relatívnu náhradu sa počíta ak sú zvieratá používané len v určitej časti pokusu čím je distres počas pokusu minimalizovaný. Absolútna náhrada je ak sa vnímavé, živé zvieratá nepoužijú v žiadnej etape pokusu. Tkanivové kultúry predstavujú prechod medzi relatívnu a absolútnou náhradou. Redukcia patrí k metódam, ktoré umožňujú výskumníkom znižovať počet zvierat využitých na výskum bez toho, aby sa štatistická významnosť znížila. Z hľadiska štatistickej významnosti je mimoriadne dôležité určenie počtu zvierat potrebných pre určitý typ biomedicínskeho výskumu. Významnosť testu musí byť taká, aby umožnila posúdiť klinickú významnosť sledovaného javu. Aj keď je rozdiel nižší, dajú sa urobiť určité závery (trendy) bez toho aby bolo potrebné zvýšiť počet zvierat. K tomu je potrebné aby boli splnené dve základné požiadavky, a to, aby rozdiely mali normálne rozloženie a bolo možné určiť štandardnú odchýlku.

Zjemnenie (*refinement*) je zabezpečené vyššou starostlivosťou o použité zvieratá. Štvrté R (*responsibility*) má za cieľ (**Bark, 1995**) zvýšenie zodpovednosti vedcov pri využití zvierat na pokusy.

Report A2005 predložil konsenz ohľadom pokusov na zvieratách v súčasnosti. Zároveň predložil návrh na základné postupy a dodržiavanie podmienok štyroch R (**Perry, 2007**).

Animálne modely je možné v zásade zdeliť do skupín (**Hau, 2008**):

- **Spontánne modely** – nazývané aj „naturálne“ modely. Patria sem prírodné sa vyskytujúce choroby zvierat alebo podmienky zodpovedajúce rovnakým chorobám u ľudí. Napr. diabetes, hypertenzia, artritída a imunodeficiencie sú ich príkladom. Mnoho stoviek zvieracích kmeňov/línii je známych pre tieto prípady.
- **Experimentálne modely**. Tieto predstavujú modely s experimentálne indukovanou chorobou. Také sú napr., aterogenéza indukovaná diétou, nádory indukované karcinogénmi a rôzne chirurgické modely.
- **Geneticky modifikované modely** predstavujú špeciálnu skupinu animálnych modelov, ktoré boli pripravené genetickou manipuláciou genómu (transgénové, alebo knockout zvieratá). Slúžia na štúdium genetickej vnímavosti alebo odolnosti voči chorobám.
- **Negatívne modely**. Určité zvieratá sú odolné na určité podmienky vedúce k chorobe. Ich štúdium poskytuje údaje o fyziologickej povahe odolnosti k chorobám.
- **Orphan (sirotčie) modely**. Ide o ochorenia, ktoré sa nevyskytujú u ľudí, napr. scrapie, ale môžu slúžiť ako analógické pre ľudskú spongiformnú encefalopatiu.

### VOĽBA VHODNÉHO MODELU

Predtým ako začneme pokus je potrebné zvoliť vhodný animálny model, resp. zvážiť použitie alternatívneho modelu. Zviera sa použije len v krajnom prípade. Pre porovnateľnosť určitých štúdií je potrebné voliť rovnakú kvalitu pokusných zvierat.

Medzi faktory vplývajúce na výber zvierat'a patria:

- Vhodnosť modelu alebo orgánového systému pre predpokladanú štúdiu.
- Genetické aspekty modelu.
- Naturálny vs. experimentálny model. Aj naturálne aj indukované modely chorôb závisia od objektu štúdia.
- Odpoveď zvierat na experimentálnu procedúru.
- Aspekty prostredia dôležité pre príslušný animálny model.
- Dostupnosť informačného pozadia o vhodnosti zvierat ako modelu.
- Vhodnosť druhu.
- Potrebný počet zvierat pre štatistické spracovanie (**Dell et al. 2002**).
- Vek a pohlavie zvierat.
- Dĺžka života zvierat.
- Veľkosť zvierat.
- Cena zvierat a náklady na ich držbu.
- Materiálové a priestorové potreby pre chov a manipuláciu zvierat.
- Hospodárnosť vyšetrení. Niektoré modely vyžadujú špeciálny spôsob chovu, alebo špeciálnu starostlivosť.

Medzi tieto faktory zaraďujeme aj niektoré úvahy čisto vedeckého charakteru. Všetky sú dôležité pre úspešnosť vedeckého programu. U väčšiny animálnych modelov pred ich výberom pre pokus je potrebné zvážiť rôzne aspekty (či špecifické kmene vyžadujú špecializovaný alebo konvenčný chov), je potrebné poznať vplyvy (neexperimentálne faktory), ktoré by mohli mať vplyv na štúdium. Tieto faktory je potrebné veľmi starostlivo zhodnotiť (**Lipman a Perkins, 2002**), najmä pre ich možný vplyv na výsledky a interpretáciu pokusu (**Festing a Altman, 2002**).

Tieto neexperimentálne faktory môžeme rozdeliť do nasledovných skupín:

- Faktory zo strany zvierat.
- Fyzikálne a environmentálne faktory.
- Chov, starostlivosť a manipulácia so zvieratami.
- Experimentálne manipulačné procedúry.

Zo strany zvierat môže vplývať na pokus celý rad faktorov a tieto je potrebné starostlivo zhodnotiť pri príprave experimentálneho dizajnu (**Gaines Das, 2002**). Medzi ne patria: genetický make-up (homogenita vs heterogenita) zvierat, inbredné vs outbredné vs mutantné vs geneticky modifikované zvieratá, vek, pohlavie a reprodukčný status, mikrobiálne osídlenie (konvenčné, SPF, gnotobiotické, germ-free), biologické rytmi, prítomnosť stresu alebo distresu, choroby (náchylnosť na choroby), zjavné ochorenia (manifestné choroby), latentné (subklinické alebo skryté) infekcie, podmienky závisiace od genotypu.

Mnohé animálne faktory sú preselektované výskumníkom: vek, pohlavie, reprodukčný status zvierat, metabolický stav (napr. mladý rýchlo rastúci, dospelý, starý). Zdravotný stav je dôležitým kritériom pri výbere zvierat do pokusu.

Z mnohých faktorov, ktoré môžu spôsobiť neočakávané komplikácie alebo odpovede sú veľmi dôležité choroby, preto je zdravotný status dôležitým kritériom pri výbere zvierat.

### ANIMÁLNE MODELY NA ŠTÚDIUM KARDIOVASKULÁRNYCH OCHORENÍ

Čo sa týka kardiochirurgie je potrebné si priznať, že podmienky ohľadom extrapolácie výsledkov animálnych

experimentov na podmienky u ľudí nie sú jednoznačne ujasnené. Nie sú jednoznačne určené ani technické podmienky pre vykonávanie animálnych pokusov pri získavaní poznatkov. Ak nie sú v dostatočnej miere ujasnené technologické podmienky výkonu experimentov nie je možné ani len predpokladať, že ich morálna a etická stránka budú v poriadku. Jasné je z uvedeného aspektu len to aby pri pokusoch boli zvieratá vystavené čo najnižšiemu diskomfortu. Jediným usmernením v tomto ohľade je platná legislatíva na ochranu pokusných zvierat v SR.

Pri využívaní zvierat pre experimentálne účely je základnou podmienkou podobnosť zvieratá z hľadiska študovaného fenoménu s modelovaným objektom, t.j. koncepcia analógie animálnych modelov. Čím je analógia užšia o to je extrapolovateľnosť výsledkov validnejšia. Extrapolácia sa využíva na vyjadrenie ako môžu byť výsledky animálnych pokusov využité pri človeku (do akej miery je ich možné aplikovať na ľudí). Úzka fylogenetická alebo morfológická podobnosť nie je rozhodujúca pre biochemické mechanizmy a fyziologické odpovede, aj keď v mnohých prípadoch tomu tak je (**Beijnen a Hau, 2001**). Veľmi dôležitým rozdielom medzi pokusnými zvieratami a ľudskou populáciou je genetická variabilita. Pokusné zvieratá sú geneticky takmer identické, oproti tomu u ľudí je veľká variabilita. Nie je možné preto stanoviť presné pravidlá pre extrapoláciu výsledkov z jedného druhu na iný druh, aj keď v literatúre boli predložené určité postupy (**Calabrese, 1991**). Pod extrapoláciou nie je potrebné mať na mysli určité matematicky vyjadriteľné veličiny, aj keď sa na to často pozerá práve z tohto aspektu, napr. pri stanovení toxicity určitých látok alebo pri určení farmakologicky efektívnych dávok liekov. Podľa nášho názoru základný význam spočíva skôr v zistení toxikologickej alebo terapeutickkej účinnosti látok. Pre konkrétne určenie toxikologickej alebo biologicky účinnej dávky ich treba brať pri extrapolácii len ako možné východisko. Práve preto, ako pri akomkoľvek type výskumu treba mať na zreteli, že využívanie animálnych modelov si nekladie za hlavný cieľ bezprostrednú extrapoláciu výsledku na človeka, ale hľadá odpoveď na otázky experimentátora. Preto je pri posudzovaní potreby pokusu na zvieratí v prvom rade posúdiť, či pokus dá relevantnú odpoveď na otázku experimentátora a či odpoveď na otázku obohatí súčasné poznanie o danom jave. Práve preto hypotéza (otázka) má byť podrobená analýze pred pokusom (schvaľovanie animálnych experimentov; etické komisie, vstupné oponentúry), odpoveď po publikovaní výsledkov (odpovede na otázku) verejnou obhajobou (ohlasy).

Pri výbere druhu zvieratá na pokus treba vychádzať z čo najväčšej podobnosti medzi modelom a modelovaným objektom, aby zistené výsledky mali čo najvyššiu konkordanciu a tým extrapolácia bola validná. Je dobre známe, že rýchlosť metabolizmu u malých zvierat je omnoho vyššia ako u veľkých, preto je veľkosť tela jedným z podstatných ukazovateľov a východísk pri extrapolácii, a práve na základe toho boli predložené i metódy extrapolácie pre výpočet toxických alebo efektívnych dávok zlúčenín (**Hau, 2008**).

Hlodavce sú bežne používaným modelom pre skúšanie nových farmakologicky účinných látok nielen v súvislosti s transplantáciami (imunosupresíva) ale aj z hľadiska terapie resp. prevencie kardiovaskulárnych ochorení

u ľudí. Bežne sú používané potkany a myši aj pri testovaní bezpečnosti a účinnosti nových perorálne účinných látok.

Pokusné zvieratá používané pre potreby kardiológie môžeme v podstate zaradiť do niekoľkých skupín:

- Zvieratá s diétou indukovanými chorobami kardiovaskulárneho systému.
- Zvieratá so spontánnym vznikom chorôb kardiovaskulárneho systému.
- Geneticky alterované zvieratá (transgénové modely).
- Hlodavce so spontánnou aterosklerózou rôznej etiológie:
  - Diabetické modely
  - Obézne modely
- Modely hlodavcov, izolované selektívnym krížením z normálnych kmeňov.
- Nehlodavce, najmä na štúdium chirurgických intervenčných postupov:
  - Primáty
  - Ošípané
  - Psi
  - Mačky.

V kardiochirurgii je celý rad problémov, ktoré je potrebné riešiť za použitia modelových organizmov. Popri randomizovaných klinických pokusoch (RCT, *randomized clinical trial*) najmä invazívnych katetrizačných ablačných prístupov, operácií chlopní, chirurgickom ošetrovaní fibrilácie predsieni, chirurgickom ošetrovaní mitrálnej regurgitácie a CABG (*coronary artery bypass grafting*), porovnanie účinnosti CABG a VAD (*adjunctive left ventricular assist device*), ohľadom VAD v spojení s bunkovou alebo génovou terapiou, odskúšanie nových zobrazovacích techník, inštrumentov a robotizácie operačných výkonov, sa ukázalo, že ešte určitý čas nebude možné sa zaobísť bez pokusov na veľkých zvieratách. Treba poukázať aj na to, že kardiovaskulárne problémy typické pre ľudskú populáciu sa dostali do popredia záujmu aj v oblasti veterinárnej medicíny, najmä u spoločenských zvierat, u ktorých spektrum najčastejších ochorení dosť verne kopíruje situáciu v ľudskej populácii. Podobne ako u ľudí, najbežnejšími problémami sú obezita, diabetes, nádorové ochorenia, alergie, ateroskleróza a následne aj kardiovaskulárne ochorenia. Čo sa týka terapeutickú intervenciu a skvalitnenia operačných postupov môžu byť spoločné úsilie veterinárnych a humánných kardiochirurgov veľmi efektívne. Ide okrem testovania operačných postupov, najmä o také oblasti ako sú prezervácia myokardu počas kardiochirurgických úkonov a štúdiá celulárnej kardiomyoplastiky ako terapeutického východiska pri chronickom zlyhaní srdca.

Práve v Košiciach sú vytvorené pre túto spoluprácu veľmi vhodné podmienky, tým že na území mesta sa nachádza okrem nášho pracoviska, Lekárska fakulta, Univerzita veterinárskeho lekárstva a Ústav fyziológie hospodárskych zvierat. Spojenou snahou a prepojením cez projekty zamerané na preklinické testovanie postupov a techník by mohli priniesť cenné výsledky nielen pre praktickú, klinickú medicínu ale aj pre rozvoj vedného smeru. Tieto spoločné projekty by slúžili zároveň aj pre tretí stupeň vzdelávania.

Nášmu ústavu touto spoluprácou cez využitie animálnych modelov okrem vedeckého výskumu a overovania postupov, umožní aj profesionálny tréning v chirurgii a mikrochirurgii, rešpektovaním etických

princípov a legislatívy SR a EÚ. Na morfológicko-funkčnom základe je najvyššia analógia medzi človekom a prasatami. Tieto modely veľkých zvierat umožnia biomedicínske a preklinické štúdiá. Na preklinické štúdiá sú vhodné najmä pre vysokú morfológickú a fyziologickú podobnosť s človekom, a podobnou genetickou variabilitou ako u človeka. To umožňuje v určitých oblastiach pomerne bezpečne extrapolovať výsledky pre ľudskú populáciu.

### LITERATÚRA

BARK, R. E. 1995. The fourth R of research, In: *Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 54, 1995, p. 50.

BASSUK, S. S., MANSON, J. E., 2008. Lifestyle and risk of cardiovascular disease and type 2 Diabetes in women: A review of the epidemiologic evidence. In: *Am. J. Lifestyle Med.*, vol. 2, 2008, p. 191 - 213.

BEYNEN, A. C., HAU, J. 2001. Animal models. In: van ZUTPHEN, L. F., BAUMANS, V., BEYNEN, A. C.: *Principles of Laboratory Animal Science*. Elsevier, 2001, p. 284-308.

CALABRESE, E. J., 1991: *Principles of animal extrapolation*. Lewis Publishers, Inc. Chelsea, Michigan. 1991, p. 1-44.

CAPALDO, T. 2004. The psychological effects on students of using animals in ways that they see as ethically, morally or religiously wrong. In: *Altern. Lab. Anim.*, vol. 32, 2004, p. 525-531.

DELL, R. B., HOLLERHAN, S., RAMAKRISHNAN, A., 2002. Sample size determination. In: *ILAR J.*, vol. 43, 2002, p. 207-213.

FESTING, M. F. W., ALTMAN, D. G. 2002. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. In: *ILAR J.*, vol. 43, 2002, p. 244-258.

GAINES DAS, R. E. 2002. Role of ancillary variables in the design, analysis and interpretation of animal experiments. In: *ILAR J.*, vol. 43, 2002, p. 214-222.

HAU, J. 2008. Animal models for human diseases. In: CONN, P. M.: *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Humana Press Inc., 2008, p. 3-8.

HAU, J. 2008. Should live animals be used when educating future biomedical scientists? In: *ALTEX*, vol. 23, 2008, p. 42-45.

HENDRIKSEN, C., CUSSLER, K., HALDER, M. 2002. ECVAM's role in the implementation of the three Rs concept in the field of biologicals. In: *Altern. Lab. Anim.*, vol. 30, 2002, p. 41-46.

LIPMAN, N. S., PERKINS, S. E. 2002. Factors that may influence animal research. In: FOX, J. G., ANDERSON, L. C., LOEW, F. M., QUIMBY, F. W.: *Laboratory Animal Medicine*, 2<sup>nd</sup> Orlando: Academic Press. 2002, p. 11434-1184.

MOZAFFARIAN, D., WILSON, P. W. F., KANNEL, W. B. 2008. Beyond established and novel risk factors: Lifestyle risk factors for cardiovascular disease. In: *Circulation*, vol. 117, 2008, p. 3031 - 3038.

NIŠTIAR, F., NIŠTIAROVÁ, A., BEŇAČKA, R., RÁCZ, O., LUKAČÍNOVÁ, A. 2006. Quo vadis pokusy na zvieratách v edukácii a vo výskume. [Quo vadis experiments on the animals in education and research]. In: *Slov. Vet. Čas.*, vol. 31, 2006, p. 289-291.

NIŠTIAR, F., RÁCZ, O., BEŇAČKA, R., LUKAČÍNOVÁ, A. 2009. Animálne modely pri štúdiu diabetes mellitus – výhody a nevýhody – I. časť. [Animal models at study of diabetes mellitus – advantages and disadvantages – part I]. In: *Slov. Vet. Čas.*, vol. 34, 2009, p. 114-117.

PERRY, P. 2007. The ethics of animal research: a UK perspective, In: *ILAR J.*, vol. 48, 2007, p. 42–46.

PIERSMA, A. H. 2004. Validation of alternative methods for developmental toxicity testing. In: *Toxicol. Lett.*, vol. 149, 2004, p. 147-153.

RETELNY, V. S., NEUENDORF, A., ROTH, J. L. 2008. Nutrition protocols for the prevention of cardiovascular disease. In: *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 23, 2008, p. 468 - 476.

RUSSELL, W. M. S., BURCH, R. L. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, UK: Methuen. 1959, p. 1-238.

WORTH, A. P., BALLS, M. 2002. Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status and future prospects. In: *Alter. Lab. Anim.*, vol. 30, 2002, p. 1-125.

### Pod'akovanie:

Táto práca vznikla pri riešení vedeckého projektu podporovaného Slovenskou grantovou agentúrou VEGA číslo 1/3494/06.

### Kontaktná adresa:

MUDr. Štefan Lukačín, Klinika srdcovej chirurgie, Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s., Ondavská ulica č. 8, 04011 Košice  
MVDr. Agnesa Lukačínová, PhD., Ústav fyziológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, e-mail: frantisek.nistiar@upjs.sk

## EFFECT OF LIFETIME LOW-DOSE EXPOSURE WITH HEAVY METALS ON SELECTED PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS

*Agneša Lukačínová, Oliver Rác, František Ništiar*

### ABSTRACT

Chronic, low level exposure to toxic metals is an increasing global problem. The aim of the present investigation was to evaluate the effects of lifetime (156 week) exposure to low-level of lead, cadmium, and mercury dissolved in tap water (200-times above maximal permissible dosage) on selected physiological, reproductive, and biochemical parameters of 80 Wistar rats (40 males, 40 females). The animals were divided into 4 groups – control, and three groups exposed by metals (Pb, 100  $\mu\text{mol/l}$ ; Hg, 1  $\mu\text{mol/l}$ ; 20  $\mu\text{mol/l}$ , resp.). The symptoms associated with the slow accumulation of toxic metals are multiple and rather nondescript, and overt expression of toxic effects may not appear until later in life. Early detection and treatment of metal burden is important for successful detoxification, and optimization of nutritional status is paramount to the prevention and treatment of metal toxicity. Investigated parameters suggested interesting phenomenon of adaptation, probably chemical hormesis to low-dose in the group exposed with cadmium. This phenomenon was not detected in groups exposed to mercury and lead, where development (generated) in accordance with anticipations.

**Keywords:** low-dose exposure, heavy metals, hormesis, toxicity

### INTRODUCTION

There are approximately 35 heavy metals in our environment. Heavy metals become toxic when they are not metabolized, which allows them to accumulate in many organs (Jarup et al., 1998; Trinchella et al., 2006). Heavy metals are, unfortunately, present in the air, water, and food supply. Cases of severe acute lead, mercury, arsenic, and cadmium poisoning are rare; however, when they do occur an effective, non-toxic treatment is essential. In addition, chronic, low-level exposure to lead in the soil and in residues of lead-based materials; to mercury in the atmosphere, in dental amalgams and in seafood; and to cadmium and arsenic in the environment and in cigarette smoke is much more common than acute exposure (Hochella et al., 2008), targeting the kidneys, gonads, liver and vascular systems in particular (Lukáč et al., 2007; Prozialeck et al., 2008).

The sulfhydryl-reactive metals (e.g., mercury, cadmium, lead) are particularly insidious and can affect a vast array of biochemical and nutritional processes. The primary mechanisms by which the sulfhydryl-reactive metals elicit their toxic effects are pro-oxidative actions of the metals are compounded by the fact that the metals also inhibit antioxidative enzymes and deplete intracellular glutathione (Manna et al., 2009). The metals also have the potential to disrupt the metabolism and biological activities of many proteins due to their high affinity for free sulfhydryl groups. Cysteine has a pivotal role in inducible, endogenous detoxication mechanisms in the body, and metal exposure taxes cysteine status. The

protective effects of glutathione and the metallothioneins are very important in toxic effects of heavy metals (Klaassen et al., 1999). Basic research pertaining to the transport of toxic metals into target organs and tissues. Metal exposure also affects essential element status, which can further decrease antioxidation and detoxification processes.

The primary objective of this study is to highlight the general effects of toxic metals on biochemical and nutritional processes in rats, and to find the most suitable and precise indicators for estimations of the risks of the chronic low-dose intoxications with heavy metals on healthy state of population, provide rationale preventive and therapeutic intervention. Knowledge of the mechanisms by which toxic metals affect a vast array of metabolic processes will help clarify why the symptoms of metal burden are numerous and nondescript.

### MATERIALS AND METHODS

Outbreed Wistar albino-rats (80 animals; 40 females and 40 males, age 4 weeks, average weight  $120 \pm 19$  g) and their 28-days old newborns (older young's were transferred into another experiment). The females and males were kept in couples in separate cages with free access to water and food and light/dark cycle 12:12 hours at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , and relative humidity of 50%. The experiment was terminated on 156<sup>th</sup> week. Experiments were performed in Central animal facility of the Medical faculty with accreditation for laboratory animal-breeding. The experiments were approved by local Ethical Committee



**Table 1** Summarized results from low-level exposure with heavy metals during 156 weeks

Parameter	Control	Pb	Cd	Hg
% survival rats	90	55	75	30
LADD mg/kg/d	0	2.15	0.13	0.036
Intake % from LD <sub>50</sub> during experiment	0	51.6	64.2	107.8
Life span (day)	1119±93	950±287	1073±143	823±293
Body mass (g)	660±17	431±22	615±17	362±25
Water intake ml/rat/day	40±1.3	44±4.2	29.5±2.2	49.5±2.6
Food intake g/rat/day	19.8±1.7	21.2±3.4	18.3±1.4	23.0±4.1
Number of partes/number of neonates	98/754	106/853	90/706	128/1015
% weanlings	90,3	59.2	82.3	47.1
Serum total protein in g.l <sup>-1</sup>	68.4±1.8	78.8±1.8	48.9±1.2	86.7±3.1
Serum albumin in g.l <sup>-1</sup>	45±0.6	40.6±5.2	31.3±1.8	47.3±11.3
Serum transferin in g.l <sup>-1</sup>	2.98±0.2	4.97±0.8	9.51±0.5	2.7±1.5
Serum ferritin in µg.l <sup>-1</sup>	744±63	2546±484	6896±897	842±298
Glycaemia in mmol.l <sup>-1</sup>	7.3±0.18	6.98±0.25	8.7±0.99	8.3±0.38
Cholesterol in mmol.l <sup>-1</sup>	2.84±0.15	2.97±0.18	2.81±0.24	5.68±0.5
Triglycerides in mmol.l <sup>-1</sup>	1.8±0.07	1.98±0.11	1.81±0.14	2.93±0.66
Lactate dehydrogenase µmol.l <sup>-1</sup>	5.8±1.4	9.9±2.2	6.1±2.7	11.4±4.1
γglutamyl transferase µcat.l <sup>-1</sup>	0.6±0.01	0.8±0.02	0.9±0.2	0.3±0.1
Aspartate aminotransferase µcat/l	1.54±0.2	2.34±1.1	2.4±0.3	11.8±3.6
Alanine aminotransferase µcat.l <sup>-1</sup>	0.88±0.1	3.7±0.9	2.6±0.5	15.2±3.6
Lipase µcat.l <sup>-1</sup>	3.0±0.02	3.97±1.8	2.5±0.3	4.2±0.7
Alkaline phosphatase µcat.l <sup>-1</sup>	2.8±0.3	2.2±0.4	1.18±0.1	1.02±0.5
Hemoglobin g.l <sup>-1</sup>	112±11	84±17	147±14	121±22
Urea mmol.l <sup>-1</sup>	17.1±1.6	24±4.8	21±2.1	34±4.8
Creatinine µmol.l <sup>-1</sup>	296±12	331±69	342±37	380±68
Bilirubine µmol.l <sup>-1</sup>	9.4±0,7	14.8±1.9	12.1±0.4	15.3±5.1
Uric acid µmol.l <sup>-1</sup>	208±62	242±121	132±33	312±142
Superoxid dismutase U/mg of Hb	15.7±0,6	11.9±0,9	4.3±0,05	2.9±1,9
Glutathione peroxidase U/mg of Hb	24.1±1,9	23±3,9	14.8±1,0	6.6±2,3
Catalase mmol/mg of Hb	1.61±0,6	0,97±0,6	1.22±0,5	0.65±0,41
Glutathione µmol.l <sup>-1</sup>	26.9±2,1	11.5±3,3	31.6±2,6	20.8±5,8
Total antioxidant status mmol.l <sup>-1</sup>	1.22±0,14	0.98±0,33	1.48±0,4	0.63±0,28
Tumors	-	-	+	+
Morphological malformations	-	+	+	+

and the State Veterinary Agency (No. Ro-7879/04-220/3). The animals were divided randomly into 4 groups (10 females and 10 males in each). Always 1 female and 1 male was kept in separate cage. While control rats (group C, n = 20) did not received any additives into the tap

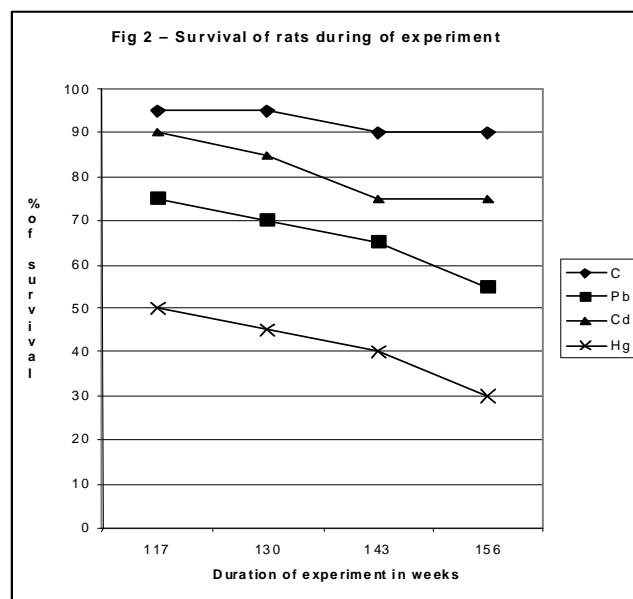
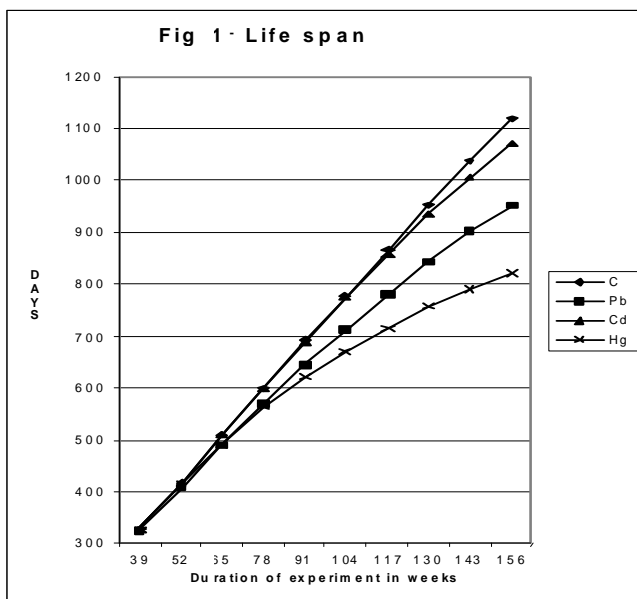
water, 3 other groups were given metal-containing compounds diluted in tap water in amounts such that the metal content was 200–times higher than the maximal allowable concentration in drinking water (MAC). Second group (signed as Pb; n = 20) received the water with 100 µmol.l<sup>-1</sup> of the lead acetate in alkaline solution (contains 20,0 mg of Pb.l<sup>-1</sup>), third group (Cd; n = 20) was added 20 µmol.l<sup>-1</sup> of cadmium dichloride dehydrate (contains 2,0 mg of cadmium.l<sup>-1</sup>), and fourth group (Hg; n = 20) was given the water with 1 µmol.l<sup>-1</sup> of mercurous dichloride (0,2 mg of mercury.l<sup>-1</sup>).

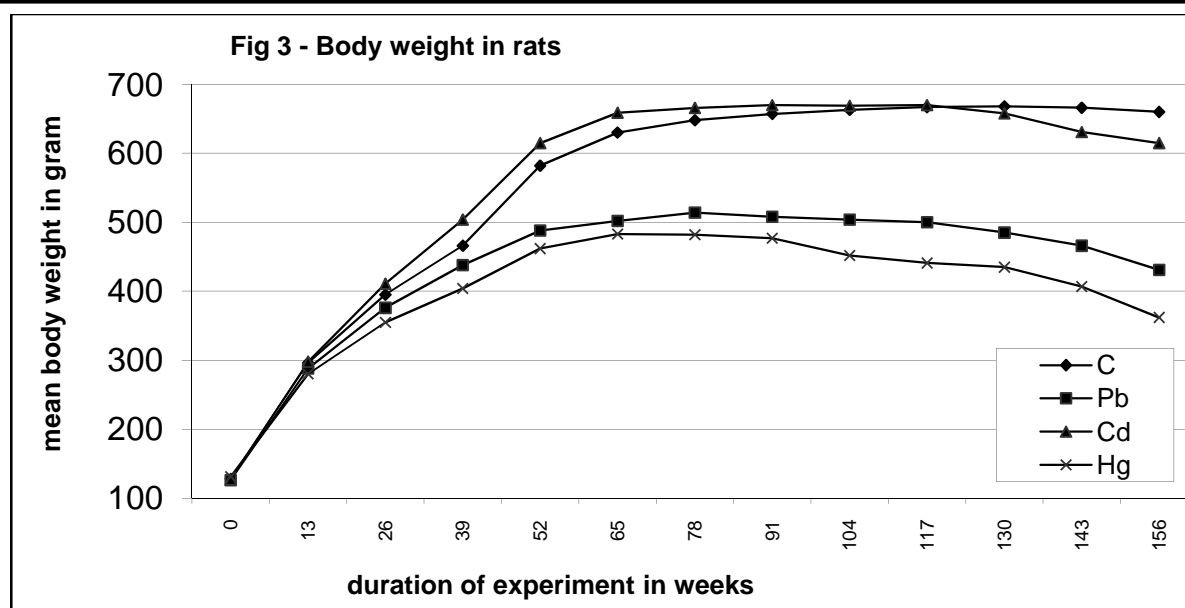
Parameters of reprotoxicity such as number of litters, total number of newborns (assigned in the birth day), number of newborns per litter and number of weanlings (raised young's that reached the 28<sup>th</sup> day of life) were measured during the reproductive cycle to 78<sup>th</sup> week.

The weight gain, food and water intake were determined daily in the morning. Blood samples was collected through the rat tail vein in morning and was centrifuged at 1 000 g for 10 min. Plasma was separated and buffy coat was discarded by aspiration. Erythrocytes were washed three times with cold physiological saline and stored at -20°C until analysis.

From biochemical parameters we measured: total protein (TP), albumin, transferin, ferritin, glucose, cholesterol,

triglycerides, lactate dehydrogenase (LDH), γ-glutamyltransferase (GMT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lipase, alkaline phosphatase (ALP), hemoglobin (Hb), urea, creatinine, bilirubin, and uric acid with commercially kits DOT





Diagnostics (Czech Republic).

Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and erythrocyte catalase (CAT) activities of erythrocytes were estimated for the hemolysates by the use of commercially available kits (Randox Laboratory, UK). Whole blood glutathione (GSH), and TAS was measured using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay (Randox Laboratory, UK).

Data were expressed as mean±S.D. For statistical evaluations of significant differences pair- and unpaired t-test were used in combination with Wilcoxon-Mann-Whitney U-test (Stat graphic) or one-way ANOVA supplemented by Newman-Keuls post-hoc test. The dates were considered significant if  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

The objectives of this study were to compare and to clarify toxic effects of long-term oral exposure to low dose heavy metals (concentration of Pb - 10 mg.l<sup>-1</sup>, Hg - 0,2 mg.l<sup>-1</sup>, Cd - 2 mg/L in drinking water) on the four groups (with control group without heavy metal exposure) of Wistar rats during 156 weeks. In this period were determined various parameters, including toxicological, physiological, reprotoxicological and biochemical parameters (including antioxidant status). Our results are presented in Table 1. In Fig. 1 we demonstrate mean life span. Fig 2 showed survival of rats during experiment. Fig 3 presented progress of body mass.

An increase in ALT, AST and LDH indicates liver damage (Scheig, 1996). LDH is another index of hepatotoxicity, although the plasma LDH level is relatively insensitive (Sherlock and Dooley, 2002). Some heavy metals may competitive inhibited biological effects of many essential trace elements (Nad' et al., 2007; Jihen et al., 2008).

The female rats brought forth from 13<sup>th</sup> to 78<sup>th</sup> week of experiment. The number of litters, was higher in rats exposed to Pb and Hg than in the healthy unexposed animals (Tab. 1). Significantly lower values were observed in animals exposed to Cd, which did not show significant difference from the control group.

Similar to the number of litters, the highest number of newborns was observed in Hg-group (n = 1015) followed

by the group exposed to lead (n = 853). In both these groups number of surviving newborn was much higher compared to control group (754). The Cd-group showed markedly lower number of newborns (n = 706) than the Hg and Pb-groups but significantly higher values when compared to control group.

From the 13<sup>th</sup> to 39<sup>th</sup> week of exposition the average number of newborns per litter was higher in all intoxicated groups compared to control in the following order Hg>Pb>Cd>C.

Differences between the groups treated by different metals were also observed in the dynamics of reproductive response, i.e. time of the onset, time course of reproduction rate and the off-set of the reproduction burst over the experimental period (78 weeks). Hg and Pb groups showed steep and continuous rise in the number of litters and newborns early after the beginning of experiment but this was maintained only until the 26<sup>th</sup> week and was followed by a fast decline. On the other side both the Cd and the control group revealed low-grade sustained reproduction rate over the initial 39 weeks. On 52<sup>nd</sup> week the number of newborns in all groups was approximately the same and gradually declined until the end of 78<sup>th</sup> week. The sharpest decline was noted in Pb group.

The number of newborns in a litter is a useful indicator of the reprotoxicity in general, particularly in longitudinal studies. Surprisingly, from the beginning until 39 week of the trial the lowest values of newborns per litter were recorded regularly in the control females. On the 52<sup>nd</sup> week the counts from different groups were quite similar and a marked decline in females exposed to metals appeared only in the last stage of the study.

The numbers of weanlings (Tab 1), in particular when expressed as a ratio of the total number of newborns), were always lower in the all intoxicated groups compared to healthy control (Tab. 1). The lowest total number of weanlings was observed in Hg group (n = 574), followed by Pb and Cd group. (n = 599 and 606 respectively; controls 686). Similar results were obtained when comparing relative numbers of survivors to total numbers of newborns.

The present work demonstrated that the very low concentrations of heavy metals given in chronic life-long manner may provide in the rats at least temporarily stimulatory effect on the reproductive rates. Negative effects likely began only after the achieving threshold cumulative dose of metals. The nature of this response is little known but one can speculate about several adaptive mechanisms, namely hormesis (Calabrese et al., 2008). As reported with many other noxious agents chronic administration of very low-doses of metals might induce adaptive preconditioning effect which attenuates the toxic impact on physiological processes (Calabrese and Baldwin, 1998; Calabrese, 2008). This may certainly explain weakening and/or lack of response over time but can only hardly explain the immediate bursts in reproductivity after exposition. This may suggest involvement of the stress-related self-protecting biological mechanism aimed to preservation of species similar to what can be observed in other life threatening situations (Cook and Calabrese, 2006).

Among useful parameters for any definitive conclusions when viewed in the context of other selected parameters they provide good prediction value for the reprotoxicity evaluation after heavy metal exposition belongs mainly proportion of weanlings from total number of newborns, numbers of weanlings and increase in the numbers of newborns was also found by the other authors experimenting with chronic exposition to heavy metals increased mortality throughout the first 2 weeks much higher doses (Paksy et al., 1996).

Even that this parameter itself may be of partial value for any definitive conclusions when viewed in the context of other selected parameters they provide good prediction value for the reprotoxicity evaluation after heavy metal exposition.

Some parameters of the blood biochemistry and data of reproductive parameters documented in case of exposure with cadmium, activation of specific hormetic mechanisms (Calabrese and Blain, 2005).

Heavy metals such as cadmium, mercury and lead, are widely distributed in the environment due to their use in industry. Cd, one of the most common toxic heavy metals, can induce and bind to metallothionein, which concentrates Cd up to 3000-fold (Klassen et al., 1999). Free Cd, which has not binding with metallothionein, changes the enzyme activity and membrane structure by reacting with the sulfhydryl group of the membrane (Foulkes, 1982).

When exposed to Cd, the levels of ALT and AST were usually increased, which indicated liver injury. Oxidative stress is a major cause of heavy metal induced toxicity. Dong et al. reported that toxic metals, such as CdCl<sub>2</sub> and V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through an oxidative stress mechanism (Dong et al., 1998). Exposure to CdCl<sub>2</sub> leads to a decrease in the activities of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase and catalase (Jurczuk et al., 2004), and to an increase in the activity of glutathione S-transferase in the liver (Casalino et al., 2004). At the cellular level, Cd depletes glutathione and protein-bound sulfhydryl groups, leading to increased lipid peroxidation and enhanced intracellular oxidized states (Koyu et al., 2006).

In certain pathophysiological situations, Cd also causes apoptosis and necrotic cell death (Kim et al., 2003).

The results of this study showed some differences among heavy metal groups and control group, and had treatment-time related effects. Most of these changes became more expressed – and, partly significant – by the ending of the experiment in multigenerational study (here not presented). Our results can help as a basic point for choice of sensitive biomarkers of chronic intoxication with heavy metals.

### CONCLUSION

Toxic metals, such as Cd, Hg and Pb, pose serious risks to human health (ATSDR, 2005). Therefore early detection of metal accumulation is paramount to successful treatment and avoidance of irreversible damage. Hair elemental analysis provides a useful screen for the initial detection of toxic metal exposure (Jenkins, 1989). A provoked urine elements challenge might then be performed for confirmation, and to establish baseline levels of toxic elements. Because metals are not biodegradable, they can persist in the environment and produce a variety of adverse effects. Exposure to these metals can result in damage to a variety of organ systems (Hughes, 2002; Ibrahim et al., 2006) and, in some cases, these metals also have the potential to be teratogenic and carcinogenic (Waalkes et al., 1992; Han et al., 2000; Kitchin, 2001). Even though the importance of metals as environmental health hazards is now widely appreciated, the specific mechanisms by which metals produce their adverse effects have yet to be fully elucidated. Oxidative stress, an important mechanism associated with toxic effects of these heavy metals (Krizbai et al., 2005; Liu et al., 2009). The heavy metal ions form complexes with proteins, in which carboxylic acid (–COOH), amine (–NH<sub>2</sub>), and thiol (–SH) groups are involved. These modified biological molecules lose their ability to function properly and result in the malfunction or death of the cells. When metals bind to these groups, they inactivate important enzyme systems, or affect protein structure, which is linked to the catalytic properties of enzymes. This type of toxin may also cause the formation of radicals, dangerous chemicals that cause the oxidation of biological molecules. Some diseases associated with heavy metal ions are as: The sulfhydryl-reactive toxic metals have no metabolic function and their accumulation in the body has serious adverse health effects. Metal burden taxes nutritional status, which impacts negatively on antioxidative and detoxification processes. On the other hand, optimization of nutritional status by means of appropriate nutritional support can minimize the daily accumulation, and enhance the excretion, of toxic metals.

There is a wealth of data on the morphological and physiological alterations after acute and chronic expositions by toxic levels of heavy metals as occurrence of tumors, embryonic developmental and reproductive abnormalities (Massányi et al., 2004), growth retardation, loss of tail, skin pathology including loss of hairiness or even alopecia, bleeding into inner organs and cavities, diarrhea etc. In comparison with these traditional views the present work disclosed new, unexpected and in some aspects contradictory data about the reprotoxicity effects

of chronic sub toxic exposition to heavy metals. The surprising observation was the transient but considerable rise in the total reproduction rate in groups exposed to all heavy metals. The order of the survival rate of newborns in these groups (Cd>Pb>Hg) was near inversely proportional to the absolute reproduction rate given by numbers of litters and young's (Hg>Pb>Cd). The exposition to mercury, thus, induced the highest reproduction rate on account of lowest survival rate of offspring's. In the group intoxicated with cadmium the reproduction parameters were closest to the healthy control. The number of weanlings in absolute values or expressed as a ratio of the total number of newborns appears to be most practical marker as to the outcome of progeny in reprotoxicity tests. In order to reevaluate current data and to elucidate the mechanism involved in low-dose action of heavy metals on the reproduction capacity the present measurements have to be extended by additional biochemical, immunological and genetic analyses (Sato and Kondoh, 2002; Waisberg et al., 2003; Biser et al., 2004). Further more detailed comparisons are planned in several directions, e.g.:

(A) Role of reactive forms of oxygen and metallothionein in genetic damage.

(B) Role and/or alterations of inherent and acquired immunity in response to chronic metal expositions or

(C) Tumor genesis and carcinogenesis under long-term application of nontoxic doses of heavy metals.

We believe this initial study may provide a fertile ground for further more detailed studies of the long-term effects of sub-limit expositions to heavy metals and other toxins for the estimation of possible risks and preparation of the effective measures for their prevention.

## REFERENCES

ATSDR. 2005. *CERCLA Priority List of Hazardous Substances*. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla>.

BISER, J. A., VOGEL, L. A., BERGER, J., HJELLE, B., LOEW, S. S. 2004. Effects of heavy metals on immunocompetence of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). In: *J. Wildlife Dis.*, vol. 40, 2004, p. 173-184.

CALABRESE, E. J. 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. In: *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 27, 2008, p. 1451-1474.

CALABRESE, E. J., BALDWIN, L. A. 1998. Hormesis as a biological hypothesis. In: *Environ. Health Perspect.*, vol. 106, 1998, p. 357-362.

CALABRESE, E. J., BLAIN, R. 2005. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 202, 2005, p. 289-301.

CALABRESE, E. J., STANEK, E. J. III., NASCARELLA, M. A., HOFFMANN, G. R. 2008. Hormesis, predicts low-dose responses better than threshold models. In: *Intern. J. Toxicol.*, vol. 27, 2008, p. 369-378.

CASALINO, E., SBLANO, C., LANDRISCINA, V., CALZARETTI, G., LANDRISCINA, C. 2004. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. In: *Toxicology*, vol. 200, 2004, p. 29-38.

COOK, R., CALABRESE, E. J. 2006. The importance of hormesis to public health. In: *Environ. Health Perspect.*, vol. 114, 2006, p. 1631-1635.

DONG, W., SIMEONOVA, P. P., GALLUCCI, R., MATHESON, J., FLOOD, L., WANG, S., HUBBS, A., LUSTER, M. I. 1998. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 151, 1998, p. 359-366.

FOULKES, E. C. 1982. *Biological roles of metallothionein*. New York: Elsevier North Holland. 1982, p. 251-260.

HAN, S., PFIZENMAIER, D. H., GARCIA, E., EGUEZ, M. L., LING, M., KEMP, F. W., BOGDEN, J. D. 2000. Effects of lead exposure before pregnancy and dietary calcium during pregnancy on fetal development and lead accumulation. In: *Environ. Health Perspect.*, vol. 108, 2000, p. 527-531.

HOCELLA, M. F. jr., LOWER, S. K., MAURICE, P. A., PENN, R. L., SAHAI, N., SPARKS, D. L., TWINING, B. S. 2008. Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems. In: *Science*, vol. 319, 2008, p. 1631-1635.

HUGHES, M. F. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. In: *Toxicol. Lett.*, vol. 133, 2002, p. 1-16.

IBRAHIM, D., FROBERG, B., WOLF, A., RUSYNYAK, D. E. 2006. Heavy metal poisoning: Clinical presentations and pathophysiology. In: *Clin. Lab. Med.*, vol. 26, 2006, p. 67-97.

JARUP, L., BERGLUND, M., ELINDER, C. G., NORDBERG, G., VAHTER, M., SCAND, J. 1998. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. In: *Work Environ. Health*, vol. 24, 1998, p. 1-51.

JENKINS, D. 1989. *Biological monitoring of toxic trace metals*. U.S. Environmental Protection Agency Washington DC 1989 (Report number EPA/600/3/80/089).

JIHEN, E. H., IMED, M., FATIMA, H., ABDELHAMID, K. 2008. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: histology and Cd accumulation. In: *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, 2008, p. 3522-3527.

JURCZUK, M., BRZOSKA, M. M., MONIUSZKO-JAKONIUK, J., GALAZYN-SIDORCZUK, M., KULIKOWSKA-KARPINSKA, E. 2004. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. In: *Food Chem. Toxicol.*, vol. 42, 2004, p. 429-438.

KIM, S. C., CHO, M. K., KIM, S. G. 2003. Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. In: *Toxicol. Lett.*, vol. 144, 2003, p. 325-336.

KITCHIN, K. T. 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: Modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 172, 2001, p. 249-261.

KLAASSEN, C. D., LIU, J., CHOUDHURI, S. (1999). Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, 1999, p. 267-294.

KOYU, A., GOKCIMEN, A., OZGUNER, F., BAYRAM, D. S., KOCAK, A. 2006. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. In: *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 284, 2006, p. 81-85.

KRIZBAI, I. A., BAUER, H., BRESGEN, N., ECKL, P. M., FARKAS, A., SZATMARI, E., TRAWEGER, A., WEJKSZA, K., BAUER, H. C. 2005. Effect of oxidative stress on the functional proteins of cultured cerebral

- endothelial cells. In: *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 25, 2005, p. 129–139.
- LIU, J., QU, W., KADIISKA, M. B. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. In: *Toxicol Appl Pharmacol*, Feb 2009, in press.
- LUKÁČ, N., MASSÁNYI, P., ZAKRZEWSKI, M., TOMAN, R., CIGÁNKOVÁ, V., STAWARZ, R. 2007. Cobalt induced alterations in hamster testes in vivo. In: *J. Environ. Sci. Health A*, vol. 42, 2007, p.389-392.
- MANNA, P., SINHA, M., SIL, P. C. 2009. Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. In: *Amino Acids*, vol. 36, 2009, p. 417-428.
- MASSÁNYI, P., TOMAN, R., UHRÍN, V., RENON, P. 2004. Distribution of cadmium in selected organs of rabbits after an acute and chronic administration. In: *Ital. J. Food Sci.*, vol. 3, 2004, p. 311-316.
- NAĎ, P., MASSÁNYI, P., SKALICKÁ, M., KORÉNEKOVÁ, B., CIGÁNKOVÁ, V., ALMÁŠIOVÁ, V. 2007. The effect of cadmium in combination with zinc and selenium on ovaria structure in Japanese quails. In: *J. Environ. Sci. Health A*, vol. 42, 2007, p. 2017-2022.
- PAKSY, K., VARGA, B., LAZAR, P. 1996. Effect of cadmium on female fertility, pregnancy and postnatal development in the rat. In: *Acta Physiol. Hung.*, vol.84, 1996, p. 119-130.
- PROZIALECK, W. C., EDWARDS, J. R., NEBERT, D. W., WOODS, J. M., BARCHOWSKY, A., ATCHISON, W. D. 2008. The vascular system as a target of metal toxicity. In: *Toxicol. Sci.*, vol. 102, 2008, p. 207-218.
- SATO, M., KONDOH, M. 2002. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. In: *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 196, 2002, p. 9-22.
- SCHEIG, R. 1996. Evaluation of tests used to screen patients with liver disorders. In: *Prim. Care*, vol. 23, 1996, p. 551–560.
- SHERLOCK, S., DOOLEY, J. 2002. *Diseases of liver and biliary system*. London: Blackwell Science. 2002, p. 23-68.
- TRINCHELLA, F., RIGGIO, M., FILOSA, S., VOLPE, M. G., PARISI, E., SCUDIERO, R. 2006. Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. In: *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.*, vol. 144, 2006, p. 272–278.
- WAALKES, M. P., COOGAN, T. P., BARTER, R. A. 1992. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. In: *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 22, 1992, p. 175–201.
- WAISBERG M., JOSEPH, P., HALE, B., BEYERSMANN, D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. In: *Toxicology*, vol. 192, 2003, p. 95-117.

### Acknowledgment:

This research was supported in part by Slovak VEGA Grant Agency (Reg. No. 1/8235/01 and 1/3494/06)

### Contact address:

prof. MVDr. František Ništiar, CSc., Institute of Pathological Physiology, Faculty of Medicine UPJS, Trieda SNP 1, 040 66 Košice, Slovak Republic, : E-mail: Frantisek.Nistiar@upjs.sk

## MIKROBIOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA PÔDY PO APLIKÁCIÍ BIOKALU Z BIOPLYNOVEJ STANICE KOLÍŇANY

## MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF SOIL AFTER APPLICATION BIOSLUDGE FROM BIOGAS STATION KOLÍŇANY

Jana Maková, Zuzana Selešiová, Soňa Javoreková

### ABSTRAKT

One of the possible ways how to use decomposed substrate after continual biogas production is the application into the soil, which is connected the possible risk of some groups of microorganisms input into this environment. The aim of this work was to determine the influence of the different biosludge doses (20, 40 and 80 t per 1 ha of the soil) on the soil microbial biomass and abundance of the coliforms bacteria, thermotolerant coliforms bacteria and enterococci for 105 days under laboratory conditions. At the same time by measuring the microbial respiratory activity we investigated the process of decomposition of organic substances in the soil. The biosludge application influenced the microbial biomass only during first days of incubation and its value was higher in the soil without the biosludge application after 105 days. The coliforms bacteria were the most enumerable in the soil with the dose 80 t.ha<sup>-1</sup> biosludge and the counts of thermotolerant coliforms bacteria were lower than 1.10<sup>2</sup> CFU.g<sup>-1</sup> dry soil. The highest values of enterococci were after application of 20 t biosludge.ha<sup>-1</sup>. The higher doses of biosludge presumably inhibited this group, what was seen already after 64 days of incubation. Numbers of coliforms bacteria and enterococci in the biosludge and after its application into the soil were approximately 2 to 3 time lower than the limit values for application of sludge into the soil. Decomposition of the organic substances was about 44 % higher than in the soil without the application, what confirmed, that mineralization of organic substances increased after fertilizing by organic fertilizers.

**Keywords:** biosludge, coliforms bacteria, thermotolerant coliforms bacteria, enterococci, biogas station

### ÚVOD

V súčasnej dobe sa v celom svete zvyšuje záujem o využitie biomasy ako obnoviteľného zdroja energie. Produkcia bioplynu anaeróbnym rozkladom organických látok je nielen efektívnym spôsobom získavania energie zo živočíšnej alebo rastlinnej biomasy, ale aj ekologickým

riešením zneškodnenia biologického odpadu z poľnohospodárskej, priemyselnej či potravinárskej sféry (Gaduš, 2007). Vyhnitý biokal je možné aplikovať na ornú pôdu, avšak pôdy musia vyhovovať určitým kritériám t.j. vhodné pH, sorpčná kapacita, obsah škodlivín v pôde i v kaloch a pod., a zároveň je nutné zohľadniť

nároky poľnohospodárskych plodín na zdroje živín (Pospíšil et al., 2002). S aplikáciou biokalu súvisí aj možné riziko vstupu kadmia, olova, niklu a ďalších rizikových prvkov do pôdy (Tóth et al., 2009). Okrem toho však tento substrát prináša do pôdy aj určité spoločenstvo mikroorganizmov s možným výskytom patogénov (Malik et Ahmad, 2001), v prípade ich nedostatočnej eliminácie v bioplynovej stanici. Patogény tvoria skupinu organizmov schopných ohrozovať zdravie ľudí a spôsobovať ochorenie. Tieto organizmy dostávajúce sa do pôdy počas aplikácie odpadov môžu zostať v pôde životaschopné 2 mesiace alebo viac (Sun et al., 2006), a predstavujú riziko vstupu do potravinového reťazca, predovšetkým pri konzumácii poľnohospodárskych produktov, hlavne zeleniny v surovom stave. Naša práca sa zamerala na sledovanie tzv. indikátorov fekálneho znečistenia t.j. koliformných baktérií, termotolerantných koliformných baktérií a enterokokov po aplikácii rôznych dávok biokalu do pôdy. Podľa zákona č. 188/2003 Z. z. o aplikácii čistiarenskeho kalu a dnových sedimentov do pôdy sa ako mikrobiologické kritéria uvádzajú medzné hodnoty termotolerantných koliformných baktérií a enterokokov v množstve  $2 \cdot 10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup> sušiny.

Okrem uvedených skupín mikroorganizmov sme sledovali aj celkové množstvo biomasy mikroorganizmov v pôde a priebeh respiračnej aktivity.

## MATERIÁL A METODIKA

Predmetom nášho štúdia bol vyhnitý biokal, ktorý pochádzal z bioplynovej stanice v Kolíňanoch. Je to tmavá, nepáchnuca, heterogénna suspenzia pevných a koloidných látok. Pri odbere mal pomerne nízky obsah sušiny 1,62 %, pH 7,41 a obsah celkového dusíka 0,424 %. Obsah ťažkých kovov - Pb – 8,296 mg.kg<sup>-1</sup>, Cd – 0,451 mg.kg<sup>-1</sup> a As 0,681 mg.kg<sup>-1</sup> neprekročil medzné hodnoty koncentrácie týchto prvkov stanovené zákonom č. 188/2003 Z. z. Počty KTJ koliformných baktérií, termotolerantných koliformných baktérií a enterokokov v 1g sušiny biokalu a pôdy (pred jeho aplikáciou) sú uvedené v tab. 1.

V laboratórnom inkubačnom pokuse trvajúcom 105 dní sme biokal aplikovali do pôdy (pôdny typ hnedozem) s nasledujúcimi dávkami:

- I. kontrolný variant: pôda,
- II. variant: pôda + dávka biokalu zodpovedajúca aplikácii 20 t.ha<sup>-1</sup>,
- III. variant: pôda + dávka biokalu zodpovedajúca aplikácii 40 t.ha<sup>-1</sup>,
- IV. variant: pôda + dávka biokalu zodpovedajúca aplikácii 80 t.ha<sup>-1</sup>.

Inkubácia prebiehala pri teplote 28 °C a vlhkosť pôdy sme udržiavali na 50 % PVK. V priebehu inkubácie sme po 1., 15., 30., 64. a 105. dni sledovali nasledovné ukazovatele:

1. Početné zastúpenie koliformných baktérií a termotolerantných koliformných baktérií na Endovom agare a enterokokov na Slanec-Bartley agare platňovou zriedňovacou metódou.
2. Uhlík biomasy mikroorganizmov (C<sub>mic</sub>) fumigačnou extrakčnou metódou (Vance et al., 1987).
3. Respiračná aktivita mikroorganizmov stanovením produkcie CO<sub>2</sub> titračnou metódou (Števíková et al., 2007).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Koliformné baktérie tvoria skupinu baktérií s čeľade *Enterobacteriaceae*, ktoré sú gramnegatívne, netvorí spóry, sú schopné rásť za prítomnosti žľčových solí, fermentovať laktózu pri teplote 35 až 37 °C s produkciou kyseliny, plynu a aldehydu počas 24-48 hodín (Javoreková, 2004). Počty koliformných baktérií sa počas 105 dňového inkubačného pokusu (tab. 2) pohybovali od  $4,0 \cdot 10^2$  do  $1,6 \cdot 10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup> suš. zeminy. Najvyššie počty sme zaznamenali po 1. dni inkubácie vzoriek, a to vo všetkých variantoch, vrátane pôdy bez aplikácie biokalu. Hodnoty koliformných baktérií stúpli rádo trojnásobne v porovnaní s hodnotami v biokale a v samotnej pôde pred založením pokusu (tab. 1, 2). Ďalšou inkubáciou sa hodnoty koliformných baktérií postupne rovnomerne znižovali až do 64. dňa. Pri meraní v 105. dni však zostávajú na rovnakej úrovni iba hodnoty pri aplikácii biokalu v dávke 40 t.ha<sup>-1</sup>, v ostatných variantoch dochádza ku zvýšeniu počtu koliformných baktérií, s najvyššími hodnotami pri aplikácii biokalu v prepočte 80 t.ha<sup>-1</sup>. Sun et al. (2006) zaznamenali podobné znižovanie počtov fekálnych koliformných baktérií po aplikácii splaškových kalov do pôdy, s najnižšími hodnotami po 56 dňoch inkubácie vzoriek.

Variantom koliformných baktérií sú termotolerantné koliformné baktérie s podobnými vlastnosťami, ale so schopnosťou rásť pri teplote 42 až 45 °C. Termotolerantné koliformné baktérie sa pohybovali od  $0,4 \cdot 10^2$  do  $3,5 \cdot 10^4$  KTJ.g<sup>-1</sup> suš. zeminy (tab. 2). Po 1. dni inkubácie vzoriek sme zvýšenie počtu tejto sledovanej skupiny zaznamenali iba vo variantoch s aplikáciou biokalu, kde tieto hodnoty stúpli iba o 1 rád v porovnaní s počtami zistenými v biokale pred jeho aplikáciou do pôdy. V pôde zostávajú tieto hodnoty približne na rovnakej úrovni ako pred založením pokusu (tab. 1, 2). V priebehu ďalšej inkubácie vzoriek sme zaznamenali pokles a od 64. dňa už vo všetkých variantoch s aplikáciou i bez aplikácie biokalu boli hodnoty nižšie ako  $1,0 \cdot 10^2$  KTJ.g<sup>-1</sup> suš. zeminy.

Enterokoky tvoria skupinu mikroorganizmov, do ktorej patria druhy *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus zymogenes* a *Enterococcus durans*. Najvýraznejší vzostup týchto mikroorganizmov bol po 1. dni od založenia pokusu v pôde bez aplikácie biokalu. Vytvorením optimálnych teplotných a vlhkosťných podmienok stúpli ich počty v tomto variante rádo dvojnásobne v porovnaní s hodnotami pred založením pokusu (tab. 1, 2). Vo variantoch s aplikáciou biokalu dochádza k slabému zvýšeniu, rovnomerne so vzrastajúcou dávkou biokalu. V priebehu ďalšej inkubácie sa hodnoty vo všetkých variantoch rádo zvýšili a dosahujú od  $1,1$  do  $1,5 \cdot 10^4$  KTJ.g<sup>-1</sup> suš. zeminy. V 30. dni merania dochádza k poklesu enterokokov, pričom tieto hodnoty sa udržiavajú takmer na rovnakej úrovni až do konca inkubácie. V poslednom 105. dni merania je však

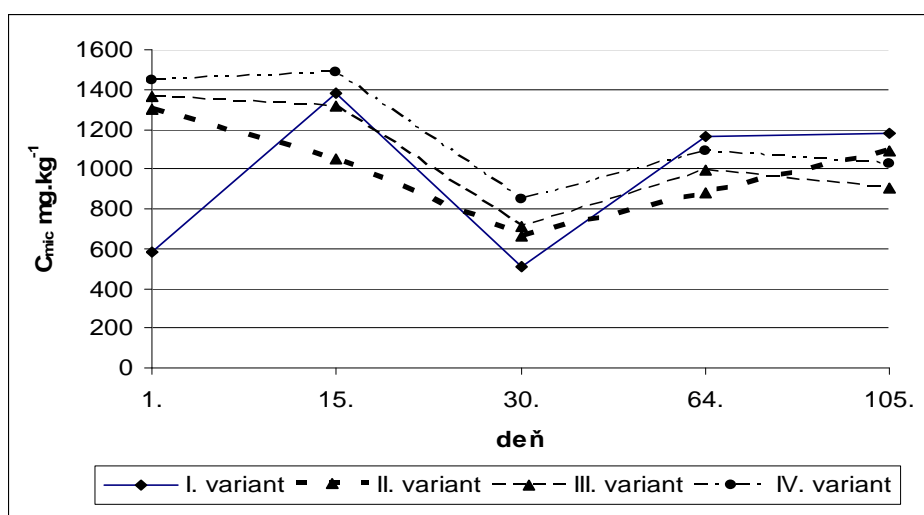
**Tabuľka 1** Počty sledovaných skupín mikroorganizmov v KTJ.g<sup>-1</sup>sušiny pôdy a biokalu pred založením inkubačného pokusu

Skupina	Pôda	Biokal
Koliformné baktérie	$1,1 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$
Termotolerantné koliformné baktérie	$6,5 \cdot 10^2$	$8,3 \cdot 10^3$
Enterokoky	$3,7 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^3$



**Tabuľka 2** Počty sledovaných skupín mikroorganizmov v KTJ.g<sup>-1</sup> sušiny pôdy v priebehu inkubácie vzoriek

Skupina	Variant	Deň merania				
		1.	15.	30.	64.	105.
Koliformné baktérie	I.	1,0.10 <sup>5</sup>	3,4.10 <sup>3</sup>	6,8.10 <sup>3</sup>	4,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>3</sup>
	II.	1,5.10 <sup>5</sup>	3,0.10 <sup>3</sup>	5,2.10 <sup>3</sup>	7,0.10 <sup>2</sup>	2,6.10 <sup>3</sup>
	III.	1,6.10 <sup>5</sup>	1,6.10 <sup>4</sup>	5,2.10 <sup>3</sup>	4,0.10 <sup>2</sup>	4,0.10 <sup>2</sup>
	IV.	1,3.10 <sup>5</sup>	8,6.10 <sup>3</sup>	7,3.10 <sup>3</sup>	4,0.10 <sup>2</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>
Termotolerantné koliformné baktérie	I.	2,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	1,7.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
	II.	2,8.10 <sup>4</sup>	8,6.10 <sup>2</sup>	0,4.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
	III.	3,5.10 <sup>4</sup>	8,7.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
	IV.	3,3.10 <sup>4</sup>	4,3.10 <sup>1</sup>	0,4.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
Enterokoky	I.	5,7.10 <sup>3</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>	5,5.10 <sup>3</sup>	2,1.10 <sup>3</sup>	7,9.10 <sup>3</sup>
	II.	4,9.10 <sup>3</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>	6,1.10 <sup>3</sup>	3,2.10 <sup>3</sup>	9,7.10 <sup>3</sup>
	III.	7,3.10 <sup>3</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>	7,4.10 <sup>3</sup>	2,7.10 <sup>3</sup>	5,7.10 <sup>3</sup>
	IV.	7,8.10 <sup>3</sup>	1,5.10 <sup>4</sup>	8,4.10 <sup>3</sup>	2,3.10 <sup>3</sup>	3,4.10 <sup>3</sup>



**Obrázok 1** Uhlík biomasy pôdnych mikroorganizmov počas inkubácie pôdnych vzoriek

pozorovaný inhibičný účinok vyšších dávok biokalu na počty enterokokov.

Hodnoty uhlíka biomasy pôdnych mikroorganizmov sa pohybovali od 508,69 do 1486,32 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny zeminy. Ako je zrejme z obrázku 1. jeho hodnoty najvýraznejšie kolísali v I. kontrolnom variante bez aplikácie biokalu. Fluktuácia hodnôt biomasy mikroorganizmov v pôdach s aplikáciou biokalu má počas celej inkubačnej doby takmer podobný priebeh v III. a IV. variante, s vyššími hodnotami biomasy pri aplikácií 80 biokalu. ha<sup>-1</sup>. V dobe medzi 64. a 105. dňom inkubácie môžeme podľa obrázku 1. vidieť dosiahnutie určitej homeostatickej rovnováhy takmer vo všetkých variantoch. Aj napriek tomu, že biokal priniesol do pôdy zdroje živín a mikroorganizmov, po intenzívnej mineralizácii a vyčerpaní zdrojov uhlíka a energie sa rozdiely medzi variantmi bez a s aplikáciou biokalu po 105 dňoch inkubácie takmer strácajú, dokonca vo variante bez aplikácie biokalu sú hodnoty vyššie. Výsledky sú zhodné s výsledkami Chowdhury et al. (2000) a Pedra et al. (2007), ktorí v inkubačnom experimente tiež zaznamenali po aplikácii kompostu do pôdy počiatkový výrazný nárast mikrobiálnej biomasy a postupný pokles s časom, pričom v závere pokusu sa jej hodnoty ustálili a výrazne nemenili.

V zložitom cykle premien uhlíka v prírode zaberá významné miesto produkcia CO<sub>2</sub> a s ním súvisiaca respirácia mikroorganizmov. Kumulatívne hodnoty produkcie CO<sub>2</sub> počas 105 dní inkubácie pôdnych vzoriek sú uvedené na obr. 2. Počas tohto obdobia sa uvoľnilo od 1567 do 2259 mg CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> zeminy. So vzrastajúcou dávkou biokalu ako zdroja organických látok stúpala i produkcia CO<sub>2</sub>. Pri dávke biokalu 20 t.ha<sup>-1</sup> vyprodukovali mikroorganizmy o 10 %, pri 40 t.ha<sup>-1</sup> o 22 % a 80 t.ha<sup>-1</sup> 44 % viac CO<sub>2</sub> ako pri kontrolnom variante bez aplikácie biokalu.

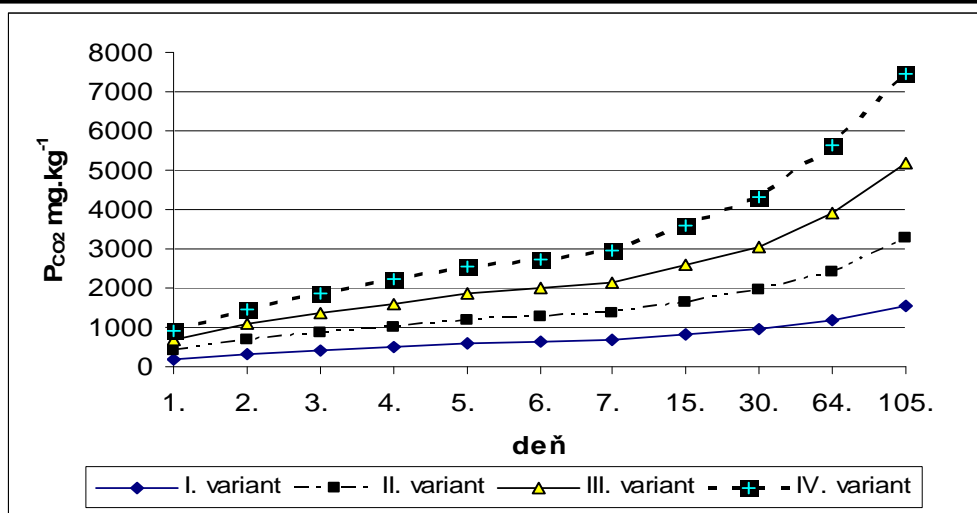
### ZÁVER

Jednou z možností ako využiť vyhynutý substrát po kontinuálnej výrobe bioplynu je jeho aplikácia do pôdy. Mikroorganizmy vstupujúce týmto substrátom do pôdy sú schopné v nej prežívať rôzne dlhú dobu. Počas 105 dní sme v laboratórnych podmienkach sledovali vplyv rôznych dávok biokalu v prepočte na 1 ha pôdy – 20, 40 a 80 t na početné zastúpenie koliformných baktérií, termotolerantných koliformných baktérií, enterokokov

a množstvo uhlíka biomasy pôdnych mikroorganizmov. Zároveň sme sledovali priebeh rozkladu organických látok v pôde meraním respiračnej aktivity mikroorganizmov. Počty koliformných baktérií a enterokokov v biokale i po jeho aplikácii do pôdy boli počas celej doby inkubácie približne 2 až 3 rády nižšie ako sú limitné hodnoty stanovené zákonom č. 188/2003 Z. z. o aplikácii čistiarenskeho kalu a dnových sedimentov do pôdy. Počty termotolerantných koliformných baktérií sme už od 64. dňa zaznamenali vo všetkých variantoch nižšie ako 1.10<sup>2</sup> KTJ.g<sup>-1</sup> sušiny zeminy. Vyššie dávky biokalu pôsobia na enterokoky zrejme inhibične, čo sa začalo prejavovať už po 64 dňoch inkubácie. Aplikácia biokalu do pôdy mala na biomasu mikroorganizmov vplyv iba v prvých dňoch inkubácie. Po 105 dňoch sa jej hodnoty ustálili, s vyššou hodnotou v pôde bez aplikácie. Pri dávke biokalu 80 t.ha<sup>-1</sup> bol rozklad organických látok o 44 % vyšší ako v pôde bez aplikácie, čo potvrdzuje, že po hnojení organickými hnojivami sa zvyšuje mineralizácia organických látok.

### LITERATÚRA

GADUŠ, J. 2007. Technické a technologické aspekty výroby bioplynu a jeho využitia. In *Predpoklady využívania poľnohospodárskej a lesníckej biomasy na energetické a*



Obrázok 2 Kumulatívne hodnoty produkcie CO<sub>2</sub> počas inkubácie pôdnych vzoriek

biotechnické využitie. Nitra : SAPV, 2007. s. 24-31. ISBN 978-80-89162-32-1.

CHOWDHURY, A. H., KOUNO, K., ANDO, T., NAGAOKA, T. 2000. Microbial biomass, S mineralization and S uptake by African millet from soil amended with various composts. In *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 32, 2000, p. 845-852.

JAVOREKOVÁ, S. 2004. *Mikroorganizmy a ich indikátorová hodnota vo vodnom prostredí*. Nitra : SPU, 2004. 81 s. ISBN 80-8069-427-3.

MALIK, A., AHMAD, M. 2002. Seasonal variation in bacterial flora of the wastewater and soil in the vicinity of industrial area. In *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 73, 2002, p. 263-273.

PEDRA, F., POLO, A., RIBEIRO, A., DOMINGUES, H. 2007. Effects of municipal waste compost and sewage sludge on mineralization of soil organic matter. In *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 39, 2007, p. 1375-1382.

POSPIŠIL, R., ŽEMBERY, J., BUŠO, R. 2004. Vplyv aplikácie biokalu po výrobe bioplynu na efektívnosť technológie repy cukrovej. In *Journal of Central European Agriculture*, vol. 5, 2004, no. 3, p. 202.

Obsah kadmia a niklu v pôdach a rastlinnom materiáli po aplikácii biokalu na VPP Kolíňany. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, 2009. mimor. č., s. 672-683.

VANCE E. D., BROOKES P. C., JENKINSON D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. In *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 19, 1987, no. 6, p. 703-707.

Zákon č. 188/2003 Z. z. o aplikácii čistiarenskeho kalu a dnových sedimentov do pôdy a o doplnení zákona č. 223/2001 Z. z. o odpadoch a o zmene a doplnení niektorých zákonov.

**Pod'akovanie:**

Práca vznikla za podpory agentúr VEGA 1/0404/09 a KEGA 3/6228/08. Autori práce ďakujú pani H. Blaškovičovej za pomoc pri analýzach.

**Kontaktná adresa:**

Ing. Jana Maková, PhD. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, Katedra mikrobiológie, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel. 0376414434, E-mail: Jana.Makova@uniag.sk

SUN, Y. H., LUO, Y. M., WU, L. H., LI, Z. G., SONG, J., CHRISTIE, P. 2006. Survival of faecal coliforms and hygiene risks in soils treated with municipal sewage sludges. In *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 28, 2006, p. 97-101.

ŠTEVLÍKOVÁ, T., JAVOREKOVÁ, S., TANČINOVÁ, D., MAKOVÁ, J. 2007. *Mikrobiológia I. časť*, Nitra : SPU, 2007. 105 s. ISBN 978-80-8069-847-8.

TÓTH, T., TOMÁŠ, J., POSPIŠIL, R. 2009.

**KUMULÁCIA RIZIKOVÝCH KOVŮV ZRNOM PSEUDOCEREÁLÍ**

**ACCUMULATION OF RISKY METALS IN GRAIN OF PSEUDOCEREALS**

*Eva Margitanová, Alena Vollmannová, Lívia Krížová, Gabriela Szabóová, Ľuboš Harangozo*

**ABSTRACT**

The objective of our work was to determine the range of accumulation of risky metals (Cd, Pb, Cu) in selected species of minor cereals grown under model conditions gradual loading by lead in pot trial. Relatively clean soil (from the standpoint of risky metals) from the locality of Topolčianky was used in pot trial. The tested crops were oat, millet and amaranthus gaining preferable position due to their nutritive and dietetic value. Risky elements in grain of pseudocereals were determined after mineralization by wet way method with principle of atomic absorption spectrophotometry. The pot trial was carried out for each crop in four variants: control A (basic fertilizers PK), variants B,C,D besides basic fertilizers they contain gradual doses of 5,10,15-fold of hygienic limit for Pb soil content adding in the form of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Gradual doses of Pb into the soil were the cause of high contents of Pb in all crops in variants B – D. Oat had the highest ability of lead accumulation in its grain, while in this case there was 27-fold enhancement in comparison with the highest acceptable amount. It was found out that Cd content was enhanced in all tested pseudocereal (0.1 mg/kg). The highest enhancement of limit value was assessed in grain of millet by 130 % in variant D. The highest accumulation of Cu was observed by grain of amaranthus, while there was not enhancement of the highest acceptable amount given by Foodstuffs Codex SR in any variants. All of tested crops have the ability to cumulate high amounts of heavy metals, and thus it is a risk to cultivate them on metallic loaded soil with following using in human nutrition.

**Keywords:** amaranth, millet, oat, heavy metals

## ÚVOD

Pôda je štartovacím miestom vstupu chemických kontaminantov cez poľnohospodárske plodiny do potravinového reťazca. Nadlimitné obsahy rizikových prvkov v potravinách znižujú výživovú a senzoricú hodnotu potravín a spôsobujú ich zdravotnú škodlivosť, vyvolávajú chronickú a v niektorých prípadoch až akútnu toxicitu. Ťažké kovy sú v pôde zastúpené v rôznych koncentráciách a v rozličných formách a patria medzi najzávažnejšie cudzorodé látky. Ich hromadením vo veľkom objeme, ktorý predstavuje pôda, vzniká po určitom čase potenciálny zdroj ich vstupu do biologického kolobehu. Nebezpečenstvo spočíva najmä v zmenách ich pohyblivosti vplyvom rôznych činiteľov (Makovníková et al. 2006; Stanovič et al. 2008).

Rastliny rastúce na metalicky zaťaženej pôde majú schopnosť akumulovať veľké množstvo ťažkých kovov a konzumácia takýchto rastlín môže viesť k zdravotným problémom. Rastliny majú rozdielnu schopnosť zhromažďovať ťažké kovy vo svojich tkanivách (Rattan et al. 2005).

Cereálie a pseudocereálie patria k pomerne často zastúpeným komponentom výživy. Sú základnými potravinami v rozvojových krajinách, pretože poskytujú významné množstvo energie, uhľohydrátov, proteínov a stopových prvkov pre živočíšnej a ľudskej výžive. Obsahujú niekoľko tried fenolických zlúčenín a antioxidantnú aktivitu. Príjem mnohých antioxidantov prítomných v prose, ovse, pohánke a laskavci do organizmu sa môže spájať s redukciami chorobnosti a úmrtnosti, vrátane redukcie výskytu rakoviny (Viswanath et al. 2009). V súčasnej dobe je zaznamenaný zvýšený záujem o pestovanie pseudocereálií najmä pre výživnú hodnotu týchto druhov, ako aj snaha o zvýšenie ich počtu, čo môže pozitívne prispieť ku skvalitneniu ľudskej výživy (Erley et al. 2005).

Láskavec je jednou z najstarších plodín. Patrí medzi pseudocereálie pre jeho sacharidové zloženie (62%), ktoré je však nižšie ako u bežných obilnín (Del Nobile et al. 2009).

Vysoká výživná hodnota je amarantového semena je dôvodom pre stúpajúci záujem o túto alternatívnu plodinu. Zrno amarantu má vysoký obsah bielkovín a priaznivé aminokyselinové zloženie (vysoký obsah lyzínu), čo pozitívne vplyva na zvýšenie kvality potravín (Pospíšil, 2006). Proso je považované za jednu z najstarších obilnín, resp. kultúrnych plodín vôbec. V minulosti patrilo medzi základné potraviny. Lúpané zrno, tzv. pšeno sa používa na výživu a je veľmi vhodné na kŕmne účely. Je veľmi chutné, dobre stráviteľné a výživné (Tisová, Masaryková, 1999). Má priaznivý obsah pomer živín blížiaci sa k odporúčanému pomeru bielkovín, tukov a sacharidov. Je významnejším zdrojom vitamínov, (predovšetkým skupiny B a A) než ostatné obilniny. Svojou hodnotou sa vyrovnáva ovseným vločkám. Významnou prednosťou prosa je, že nevyvoláva alergie u konzumentov s lepkovou intoleranciou a rozširuje sortiment diétnych potravín (Michalová, 1999). Ovos je produkovaný po celom svete a odlišuje sa od iných pseudocereálií tým, že otruby nie sú separované z endospermu počas mletia. Jednou zo základných zložiek ovseného zrna teda tvoria proteíny, ktorých kvantitatívne množstvo u jednotlivých odrôd závisí od vonkajších podmienok a polohy pestovania (Asp

et al. 1999). Výrazne vyšší ako u ostatných obilnín je obsah horčička, zinku, železa, mangánu a arzenu. Má značný obsah vitamínov B<sub>1</sub> a E. Možnosti širšieho uplatnenia vyplývajú z priaznivého chemického zloženia (Šudyová, Šliková, 2006). Je dokázaný vplyv ovsenej vlákniny na zníženie rakoviny zažívacieho traktu, na zníženie hladiny cholesterolu v krvi, obmedzenie srdcových a cievnych chorôb, zvýšenie psychickej stability organizmu a mnoho ďalších liečivých účinkov (Štěrba 2003; Longauer, 1999).

## MATERIÁL A METODIKA

Experiment bol realizovaný vo vegetačnej nádobovej kletke s použitím pôdy z lokality Topolčianky, v ktorej sme stanovili základne agrochemické charakteristiky (obsah P, K, Mg, pH) obsah rizikových kovov v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou, ako aj ich obsah v pôdnom extrakte NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (c = 1 mol.dm<sup>-3</sup>).

Na jednu nádobu sme navázili 6 kg pôdy a pokus sme realizovali s použitím 4 variantov (varianty A,B,C,D), z čoho variant A bol kontrolný len s prídavkom základného hnojenia PK. Nasledujúce tri varianty B, C, D obsahovali okrem základného hnojenia aj stupňujúci sa prídavok olova vo forme Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Množstvá pridaného

**Tabuľka 1** Aplikované dávky hnojenia v pôde zo sledovanej lokality Topolčianky (mg.kg<sup>-1</sup>)

VARIANTY	HNOJENIE
A	PK
B	PK+ 392mg Pb.kg <sup>-1</sup>
C	PK+ 742 mg Pb.kg <sup>-1</sup>
D	PK+1092mg Pb.kg <sup>-1</sup>

Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> zobrazuje nasledujúca tabuľka č.1.

Vzorky rastlinného materiálu boli zozbierané v plnej zrelosti a následne upravené pre stanovenie obsahu ťažkých kovov (olovo, kadmium, meď).

Zrno pseudocereálií sme mineralizovali mokrou cestou s použitím kyseliny dusičnej prostredníctvom prístroja Xpress podľa príslušnej metodiky XprAG-1 (2004). Získané mineralizáty sme následne prefiltrovali a zriedili destilovanou vodou na výsledný objem 50 cm<sup>3</sup>. Analytickou koncovkou bola atómová absorpčná spektrofotometria (AAS). Obsahy ťažkých kovov vyjadrené ako mg.kg<sup>-1</sup> rastlinného materiálu sme porovnávali s najvyššími prípustnými množstvami (NPM) určenými Potravinovým kódexom SR.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pôda z lokality Topolčianky použitá v pokuse mala nasledovné agrochemické charakteristiky: Z hore uvedenej tabuľky vyplýva, že v sledovanej pôde sa nachádza dobrý obsah prístupného draslíka (201 – 300 mg.kg<sup>-1</sup>), vysoký obsah prístupného horčička (231 – 310 mg.kg<sup>-1</sup>) a malý obsah prístupného fosforu (od 36 - 60 mg.kg<sup>-1</sup>).

Následne sme stanovili v pôde aj obsahy rizikových kovov v pôdnom výluhu lúčavkou kráľovskou a vyhodnotené

v zmysle zákona 220/ 2004 („Zákon o ochrane a využívaní poľnohospodárskej pôdy“).

Z tabuľky č. 3 vyplýva, že zistené obsahy rizikových kovov vo výluhu lúčavkou kráľovskou i dusičnanom amónnym neprevyšovali limitné hodnoty stanovené platným zákonom č. 220/2004 Z.z. o ochrane a využití poľnohospodárskej pôdy. Na základe týchto stanovení môžeme konštatovať, že použitá pôda v experimente bola relatívna čistá z pohľadu obsahu ťažkých kovov.

Našími testovanými plodinami boli laskavec, ovos siaty Atego a proso Uniqum. V experimente sme sledovali mieru kumulácie Cd, Pb, Cu v zrne týchto plodín pestovaných v modelových podmienkach so stupňovanou záťažou pôdy olovom.

Z grafu č. 1 vyplýva, že obsah Cd v zrne ovsa ani v jednom variante neprevyšoval NPM stanovenú Potravinovým kódexom SR (0,1 mg.kg<sup>-1</sup>). V zrne prosa sme meraním zistili prekročenie NPM vo variantoch B, C,

**Tabuľka 2** Charakteristika pôdy z lokality Topoľčianky

K	Ca	Mg	P	pH/H <sub>2</sub> O	pH/KCL	N
mg.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>			mg.kg <sup>-1</sup>
297	1356	252	51,88	6,94	5,23	2100

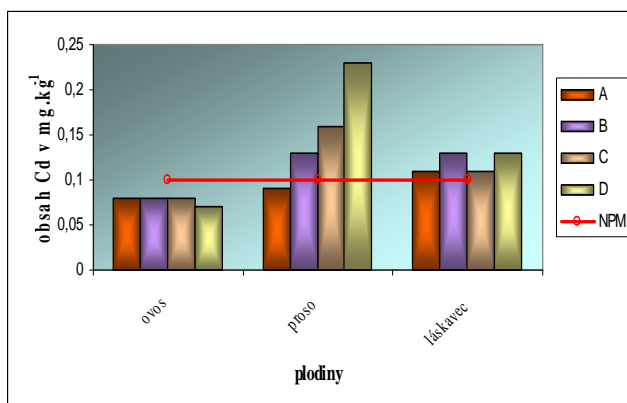
D, pričom vo variante D, to predstavovalo prekročenie až o 130%, napriek nízkemu obsahu Cd v pôde. Obsah Cd v zrne laskavca vykazuje vo všetkých kontaminovaných variantoch prekročenie NPM, dokonca aj v základnom variante A. Vo variantoch B, D sme pozorovali

**Tabuľka 3** Obsahy ťažkých kovov v pôde vo výluhu lúčavkou kráľovskou a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> vo vzťahu k limitom (mg.kg<sup>-1</sup>)

	Zn	Cu	Cd	Pb	Co	Ni
<b>Lúčavka kráľovská</b>	47,9	22,1	0,54	14	5,1	9,9
<b>Limitná hodnota</b>	150	60	0,7	70	15	50
<b>Dusičnan amónny</b>	0,09	0,03	0,015	0,195	0,13	0,15
<b>Limitná hodnota</b>	2,0	1,0	0,1	0,1	-	1,5

prekročenie NPM o 30%. Obsah Cd stúpal v poradí ovos < laskavec < proso.

Vollmannová et al. (2006) stanovili obsah Cd v zrne laskavca na 3,25 mg.kg<sup>-1</sup>, čo je 27 – krát nižšie ako nami



**Graf 1** Obsah Cd v testovaných plodinách

stanovený obsah 0,12 mg.kg<sup>-1</sup>.

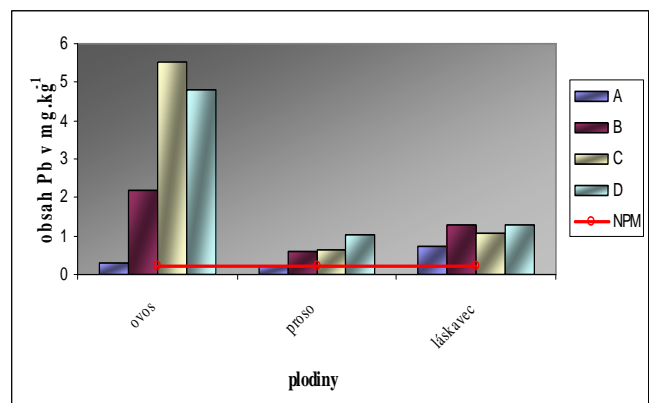
Z grafu č. 2 vyplýva, že všetky sledované plodiny svojim obsahom olova presiahli NPM (0,2 mg.kg<sup>-1</sup>) vo všetkých sledovaných variantoch. Najvyššia miera kumulácie v zrne ovsa sa zistila vo variante C, čím sa NPM prekročila 27 násobne. Obsah Pb v zrne prosa rástol priamo úmerne so zvyšujúcim sa obsahom Pb v pôde. Najvyšší obsah Pb sme namerali vo variante D, čo predstavovalo prekročenie NPM 5 – násobne. Aj v prípade zrna laskavca sme zistili najvyššie prekročenie NPM vo variante D. Obsah Pb stúpal v nasledovnom poradí: proso < laskavec < ovos.

Z výsledkov, ktoré uvádza graf č. 3 môžeme konštatovať, že obsah Cu v zrne ovsa neprekročil NPM ani v jednom sledovanom, pričom najvyšší obsah sme zistili variante A a najnižší vo variante D. Prekročenie obsahu medi vo finálnom produkte prosa sme namerali vo variante D, čím sa prekročil NPM o 88%, napriek hodnotám pôdných obsahov Cu hlboko pod hygienickými limitmi. Najvyšší obsah medi v zrne laskavca sme namerali vo variante C. Zo stanovených výsledkov môžeme zostaviť poradie obsahu medi takto: ovos < proso < laskavec.

Stavením obsahu medi v zrne laskavca sa zaoberala aj Vollmannová et al. (2006), podľa ktorej obsah medi bol 19,2 mg.kg<sup>-1</sup>, porovnaní s našimi výsledkami to bolo 2 – násobne viac. Následne sa venovala aj stanoveniu medi v zrne prose, pričom naše 9,22 mg.kg<sup>-1</sup> korešpondujú s ich výsledkami.

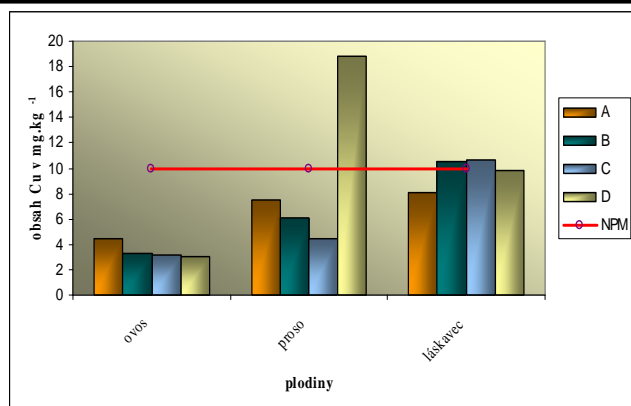
## ZÁVER

Sledované plodiny preukázali vysokú schopnosť kumulovať Pb, dokonca vo všetkých variantoch všetkých testovaných plodín sme zistili prekročenie NPM. Najvyššie obsahy olova sme namerali vo finálnom produkte ovsa a najnižšie v zrne prosa. Z nameraných a vyhodnotených výsledkov obsahu Cd v zrne sledovaných minoritných pseudocereálií, môžeme konštatovať, že laskavec a proso vykazovali vysokú kumulačnú schopnosť, pričom obsahy kadmia v zrne laskavca a prosa prekročili NPM pre potraviny, napriek nízkym hodnotám obsahov Cd v použitej pôde. Na základe zistení môžeme konštatovať, že i keď majú minoritné obilniny prospešný prínos pre ľudské zdravie je rizikom ich pestovať na metalicky zaťaženej pôde.



**Graf 2** Obsah Pb v testovaných plodinách





Graf 3 Obsah Cu v testovaných plodinách

## LITERATÚRA

ASP, N. G. 1999. Variation in dietary fibre,  $\beta$  – glucan, starch, protein, fat and hull content of oats grown in Sweden. In *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol.46, no.5, 1999, p 31 -37.

DEL NOBILE, M., DI BENEDETTO, N., SURIANO, N., CONTE, A., LAMACCHIA, C., CORBO, M. R., SINIGAGLIA, M. 2009. Use of natural compounds to improve the microbial stability of Amaranth-based homemade fresh pasta. In *Food Microbiology*, no. 26, 2009, p.151–156

LONGAUER, I. 1999. Ovos – dôležitá plodina aj vo výžive človeka. In *Naše pole*, roč. 3, 1999, č. 9, s. 27

MAKOVNÍKOVÁ, J. 2006. Anorganické kontaminanty v pôdnom ekosystéme. In *Chemické listy*, č. 100, 2006, s. 424 – 432.

MICHALOVÁ, A. 1999. Proso seté (*Panicum miliaceum* L.). In *Výživa a potraviny*, roč. 54, 1999, č.1, s. 13 – 14

POŠPIŠIL, A., POŠPIŠIL, M., VARGA, B., SVEČNĀK, Z. 2006. Grain yield and protein concentration of two amaranth species (*Amaranthus* spp.) as influenced by the nitrogen fertilization. In *Europ. J. Agronomy*, no.25, 2006, p. 250 -253.

RATTAN, R. K., DATTA, S. P., CHHONKAR, P. K., SURIBABU, K., SINGH, A. K. 200. Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater — a case study. In *Agriculture, Ecosystems and Environment*. no.109, 2005, p. 310 – 322.

SCHULTE, AUFMERLEY, G., KAUL, H. P., KRUSE B, M., AUFHAMMERB, W. 2005. Yield and nitrogen utilization efficiency of the pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat under differing nitrogen fertilization. In *European Journal Agronomy*, no.22, 2005, p. 95 - 100

STANOVIČ, R., ĀRVAY, J., MELICHÁČOVÁ, S. 2008. Obsah ťažkých kovov v pôde a v dopestovanej produkcii na južnom Slovensku. In *Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín. Zborník III. Vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou*. Nitra: SPU, 2008, 605 s. ISBN 978 – 80 – 8069 – 996 – 3

ŠČERBA, Z. 2003. Možnosti využitiť ovsu. In *Úroda*. č. 4, 2003, s. 8 – 9.

ŠUDYOVÁ, V., ŠLIKOVÁ, S. 2006. Ovos, výživa a druhá strana mince. In *Výživa a zdravie*, roč. 50, 2006, č. 3 -4, s. 30 – 31.

TISOVÁ, V., MASARYKOVÁ, M. 1999. Pestovanie a využívanie niektorých druhov netradičných plodín. In *Naše pole*. roč. 3, 1999, č. 5, s. 34 – 35.

VISWANATH, V. UROOJ, A., MALLESHI, N. G. 2009. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of finger millet polyphenols (*Eleusine coracana*). In *Food Chemistry*. no.114, 2009, p. 340–346.

PKSR 2005. Potravinový kódex Slovenskej republiky, príloha č. 2 k desiatej hlave potravinového kódexu. Najvyššie prípustné množstvá kontaminantov v potravinách platné v Slovenskej republike, aktualizované výnosom č. 3372/2004-100 zo 17. januára 2005.

VOLLMANNOVÁ, A., TÓTH, T., LAHUČKÝ, L., STANOVIČ, R. 2006. Využitie laskavca na zníženie pôdnych obsahov kadmia. In *Enviromentálne inžinierstvo*, TU Košice, 2006, s. 121 – 124. ISBN 80 – 8073 – 607 – 3.

## PodĀkovanie:

Práca vznikla s podporou projektu VEGA 1/0030/09, KEGA 3/5081/07, APVV SK-SI-0001-08.

## Kontaktná adresa:

Ing. Eva Margitanová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KCH, Trieda Andreja Hlinku 3. Tel.: 037 641 4607, E-mail: margitanova1@post.sk

## KONCENTRÁCIA VYBRANÝCH RIZIKOVÝCH PRVKOV V STEHNOVÝCH KOSTIACH HRDZIAKA HÔRNEHO (*CLETHRIONOMYS GLAREOLUS*)

## CONCENTRATION OF SELECTED HEAVY METALS IN THE FEMORA OF BANK VOLE (*CLETHRIONOMYS GLAREOLUS*)

Monika Martiniaková, Radoslav Omelka, Alena Jančová, Grzegorz Formicki, Robert Stawarz

### ABSTRACT

The concentrations of selected heavy metals (Pb, Cd, Ni, Fe, Cu and Zn) in the femora of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) living in different polluted biotopes of hillock level in Slovakia (KolĀňany and Nováky) were investigated in the present study. Altogether 24 femora of adult individuals were analysed with the method of atomic absorption spectrophotometry. We observed higher concentrations of Pb, Fe, Cu and Zn in the bones of bank voles from KolĀňany area. Significant difference was observed only for the concentration of Fe ( $P < 0.05$ ). The animals from the area of Nováky disposed higher concentrations of Cd and Ni. However, the differences were not significant in statistics. Moreover, histological analysis was done in order to determine heavy metal influence on the bone microstructure of *Clethrionomys glareolus*. We did not identify demonstrable changes in qualitative histological characteristics of the femora between the mammals from different biotopes. Anyway, our results demonstrate slightly elevated accumulation of some heavy metals in the femora of investigated mice living in KolĀňany biotope and thus give an evidence of extreme pollution of the environment.

**Keywords:** heavy metal, femur, bank vole, atomic absorption spectrophotometry, histology

## ÚVOD

Rozvoj priemyslu a poľnohospodárstva, chemická výroba a spaľovanie fosílnych palív sú spojené so vznikom veľkého množstva škodlivín, predovšetkým oxidov síry, nitróznych plynov a aj emisií ťažkých kovov, ktoré sú toxické pre všetky živé organizmy. Ich nebezpečenstvo súvisí najmä s pohyblivosťou v potravinovom reťazci a so schopnosťou ukladať sa a akumulovať (Rous a Jelínek, 2000; Dip et al., 2001).

Drobné cicavce zohrávajú významnú úlohu v mnohých potravinových reťazcoch. Väčšina z nich je na rovine herbivórnych konzumentov, druhy z radu *Insectivora* sú predátormi. Stoja na vyššej trofickej rovine a preto akumulujú väčšie množstvo ťažkých kovov ako hlodavce (Cooke et al., 1990; Ma et al., 1991; Pankakoski et al., 1992). Navyše, drobné zemné cicavce reagujú na noxie podobne ako človek a chorobné následky znečistenia sa dajú u nich zistiť skôr ako sa prejavajú na ľudskej populácii (Sládek a Mošanský, 1985). Na populáciách divo žijúcich mikromamalií môžeme skúmať pôsobenie škodliviny z kontaminovaného prostredia bez toho, aby dochádzalo k skresleniu druhotnými faktormi, ktoré so sledovaným javom vôbec nemusia súvisieť, napr. technika chovu, ustajnenie, zloženie a kvalita krmiva, veterinárna starostlivosť, atď.

Hrdziak hôrny - *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780) má súvislý areál rozšírenia, ktorý sa tiahne od Veľkej Británie a Francúzska cez strednú a východnú Európu do Strednej Ázie až po Altaj a Bajkalské jazero (Mitchell-Jones et al., 1999). Vyskytuje sa vo všetkých typoch lesa, v nížinných i horských, vrátane pobrežných porastov vodných tokov, až po nadmorskú výšku 2400 m n. m (Petrusewicz, 1983). Euryvalentný druh *C. glareolus* je najhojnejší vo vegetačnom stupni bučín, v zmiešaných a ihličnatých lesoch (Dudich et al., 1993). Ekologicky je viazaný na vlhkejšie biotopy s hustejším podrastom, ale zastihneme ho aj v krovinách, v parkoch a v zime i v blízkosti obytných budov (Viro a Niethammer, 1982). Hrdziak hôrny sa periodicky premnožuje. Ochránením v korunách lesných drevín i semenáčikov narobí často veľké škody. Na základe výsledkov Sawickej-Kapusty et al. (1987), Metchevej et al. (2001) a Martiniakovej et al. (2009) sa ťažké kovy akumulujú vo väčšom množstve v parenchymatóznych orgánoch a kosti hrdziaka hôrneho v porovnaní s ryšavkou žltohrdlou (*Apodemus flavicollis*). Z tohto dôvodu je *Clethrionomys glareolus* považovaný za ideálneho zoomonitora akumulácie a pôsobenia rizikových prvkov.

Vo všeobecnosti existuje významný vzťah medzi množstvom kovových rezíduí v pôde, vode, resp. v potrave a v orgánoch cicavcov i zástupcov ostatných tried stavovcov, predovšetkým v pečeni a obličkách (Toman et al., 2000; Stawarz et al., 2003; Jančová et al., 2006). Avšak olovo sa akumuluje najmä v kosti (Friberg et al., 1986) a kadmium spôsobuje zmeny nielen v obličkách a pečeni, ale aj v kosti (Domino, 1994). Na základe výsledkov Miliona et al. (2003) boli najvyššie koncentrácie zinku v divo žijúcich populáciách *Clethrionomys glareolus* z územia Veľkej Británie, zaznamenané v kosti.

Cieľom našej práce bolo stanoviť koncentrácie vybraných rizikových prvkov (Pb, Cd, Ni, Fe, Cu a Zn) v stehnových

kostiach (*femuroch*) hrdziaka hôrneho (*Clethrionomys glareolus*), žijúceho v rôzne znečistených ekosystémoch na území Slovenska (Kolíňany a Nováky).

## MATERIÁL A METODIKA

V práci sme použili dospelé jedince *Clethrionomys glareolus* (n=24), ktoré pochádzali z oblasti Hornonitrianskej kotliny (okolie tepelnej elektrárne v Novákoch, n=10) so silne narušenou kvalitou základných zložiek životného prostredia a z relatívne znečistenej oblasti v okolí vodnej nádrže v Kolíňanoch (Žitavská pahorkatina, n=14). Jedince boli odchytené pomocou štandardných teriologických metód a postupov (Jančová et al., 2001). Koncentrácie vybraných rizikových prvkov - olova (Pb), kadmia (Cd), niklu (Ni), železa (Fe), medi (Cu) a zinku (Zn) v ľavých stehnových kostiach hrdziaka hôrneho boli stanovené pomocou metódy atómovej absorpčnej spektrofotometrie (Martiniaková et al., 2008). Koncentrácie jednotlivých prvkov boli prepočítané a vyjadrené v mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmoty. Rozdiely v koncentráciách analyzovaných prvkov medzi jedincami žijúcimi v rôznych ekosystémoch boli stanovené pomocou T-testu (Statistica 7.0). Z pravých stehnových kostí *Clethrionomys glareolus* boli zhotovené histologické preparáty v súlade s metodikou Martiniakovej et al. (2008). Kvalitatívne vlastnosti kostného tkaniva hrdziaka hôrneho boli určené na základe klasifikácie kostného tkaniva podľa Enlowa a Browna (1956) a Ricqlésa et al. (1991).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky hodnotenia obsahu rizikových prvkov v stehnových kostiach *Clethrionomys glareolus* sú uvedené v tabuľke 1.

Zaznamenali sme vyššie hodnoty koncentrácií Pb, Fe, Cu a Zn v stehnových kostiach *Clethrionomys glareolus* z okolia vodnej nádrže v Kolíňanoch (Žitavská pahorkatina). Štatisticky preukazný rozdiel sme zistili pri koncentracii Fe (P<0,05). Drobné zemné cicavce z okolia tepelnej elektrárne v Novákoch disponovali vyššími hodnotami koncentrácií Cd a Ni, avšak štatisticky významné rozdiely sme v tomto prípade nezaznamenali. K podobným výsledkom dospeli Martiniaková et al. (2008) pri druhu *Apodemus flavicollis*. U jedincov z oblasti Kolíňany boli zistené vyššie hodnoty koncentrácií Cd, Ni, Fe, Cu a Zn; štatisticky preukazné rozdiely boli zaznamenané pri koncentráciách Ni a Zn (P<0,05). V stehnových kostiach *Apodemus flavicollis* z oblasti Nováky bola zistená len vyššia hodnota koncentrácie Pb, ale rozdiely neboli štatisticky významné. Uvedená skutočnosť poukazuje na extrémne narušenú kvalitu životného prostredia v okolí vodnej nádrže v Kolíňanoch, pravdepodobne v dôsledku intenzívnej poľnohospodárskej produkcie, ktorá súvisí s využívaním rôznych priemyselných hnojív (chemizáciou). V blízkosti odchytovej lokality prebieha vysoko frekventovaná cestná komunikácia, ktorú považujeme za ďalší významný zdroj toxických elementov. Tieto majú potenciónnu schopnosť šíriť sa vzdušnými prúdmi aj na veľké vzdialenosti. Uvedená skutočnosť naznačuje, že na znečistení životného prostredia sa môžu podieľať aj industriálne regióny ako Bratislava, Viedeň, Budapešť, alebo továrne v blízkosti



**Tabuľka 1** Koncentrácie vybraných rizikových prvkov vo *femuroch* hrdziaka hôrneho z rôznych ekosystémov

ekosystémy	štatistické ukazovatele	Pb (mg.kg <sup>-1</sup> )	Cd (mg.kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg.kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg.kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg.kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )
Kolíňany	X	20,46	4,01	9,52	212,99	4,16	188,55
	Sd	13,17	1,88	2,80	52,27	2,10	21,61
	Min	9,26	1,08	6,75	140,58	1,87	154,68
	Max	39,74	7,74	13,92	293,09	6,39	219,42
	Med	18,87	3,13	8,46	172,53	4,04	151,46
Nováky	X	20,13	4,61	9,82	138,98*	3,78	176,07
	Sd	9,51	1,13	1,89	10,15	0,74	11,20
	Min	14,08	3,71	7,93	128,19	3,20	164,21
	Max	31,09	5,88	11,69	140,42	4,61	186,14
	Med	19,84	3,76	8,17	138,17	3,81	174,14

x – aritmetický priemer, sd – smerodajná odchýlka, min – minimum, max – maximum, med – medián, \* - P<0,05

Nitrianskeho regiónu. V každom prípade, naše výsledky demonštrujú zvýšenú akumuláciu rizikových prvkov vo *femuroch Clethrionomys glareolus* z ekosystému Kolíňany v porovnaní s oblasťou Nováky, ktorá je vo zvýšenej miere kontaminovaná ťažkými kovmi a zlúčeninami síry a dusíka (Jančová et al., 2001) a z tohto dôvodu poukazujú na extrémnu kontamináciu tejto oblasti.

Pri porovnaní našich výsledkov s prácou Jančovej et al. (2001), zameranej na stanovenie koncentrácií Pb a Cd v pečeni a obličkách *Clethrionomys glareolus* z oblasti Nováky sme zistili, že najvyššia koncentrácia Pb sa pri hrdziakovi hôrnom vyskytuje v kosti, potom nasleduje oblička a pečeň, čo korešponduje s výsledkami práce Friberga et al. (1986). Identické poradie (kosť > oblička > pečeň) sme zaznamenali aj pri koncentrácii Cd. Milton et al. (2003) zistili pri druhu *Clethrionomys glareolus* najvyššiu hodnotu koncentrácie Cd v obličke, potom nasledovali kosť, pečeň a sval.

Na základe histologického výskumu kostného tkaniva hrdziaka hôrneho z rôznych ekosystémov (Kolíňany a Nováky) sme dospeli k záveru, že kostné tkanivo v okolí dreňovej dutiny (endostu) a tesne pod periostálnym povrchom je vo všeobecnosti bezcievnaté, t. j. je preň typická absencia primárnych i sekundárnych osteónov. V stredovej časti kompakty sa vyskytovali neorganizované primárne osteóny, tvoriace primárne cievnaté retikulárne kostné tkanivo. Prítomnosť sekundárnych osteónov však nebola zaznamenaná pri jedincoch z oboch skúmaných oblastí. Identické výsledky boli zistené aj pri druhu *Apodemus flavicollis* (Martiniaková et al., 2006). Popísané kvalitatívne histologické charakteristiky kostného tkaniva boli identické pri *Clethrionomys glareolus* z oboch typov prostredia (Kolíňany a Nováky), čo naznačuje, že vyššie koncentrácie Pb, Fe, Cu a Zn v stehnových kostiach hrdziaka hôrneho z okolia vodnej nádrže v Kolíňanoch nespôsobujú evidentné zmeny v kvalitatívnych histologických charakteristikách kostného tkaniva. Pre detailnejšiu analýzu v tejto oblasti výskumu by však bolo vhodné stanoviť kvantitatívne histologické charakteristiky kostného tkaniva *Clethrionomys glareolus* (napr. merať plochu, obvod, maximálny a minimálny priemer cievných kanálikov primárnych osteónov) a zistiť, či v dôsledku vyššej akumulácie rizikových prvkov nedochádza k zmenám v morfometrických ukazovateľoch kostí.

## ZÁVER

V príspevku boli stanovené koncentrácie vybraných rizikových prvkov (Pb, Cd, Ni, Fe, Cu a Zn) v stehnových kostiach hrdziaka hôrneho z rôznych ekosystémov (Kolíňany a Nováky) na území Slovenska. Vo *femuroch* jedincov z okolia vodnej nádrže v Kolíňanoch sme zistili vyššie hodnoty koncentrácií Pb, Fe, Cu a Zn. Štatisticky preukazný rozdiel bol

zaznamenaný pri koncentrácii Fe (P<0,05). Drobné zemné cicavce z okolia tepelnej elektrárne v Novákoch disponovali vyššími hodnotami koncentrácií Cd a Ni, avšak štatisticky významné rozdiely sme v tomto prípade nezaznamenali. Na základe histologickej analýzy sme zistili, že vyššie koncentrácie vybraných rizikových prvkov v stehnových kostiach *Clethrionomys glareolus* z oblasti Kolíňany nespôsobujú evidentné zmeny v kvalitatívnych histologických charakteristikách kostného tkaniva. Naše výsledky demonštrujú zvýšenú akumuláciu rizikových prvkov vo *femuroch* hrdziaka hôrneho z ekosystému Kolíňany v porovnaní s oblasťou Nováky a z tohto dôvodu poukazujú na extrémnu kontamináciu tohto ekosystému.

## LITERATÚRA

- COOKE, J. A., ANDREWS, S. M., JOHNSON, M. S., 1990. Lead, zinc, cadmium and fluoride in small mammals from contaminated grassland established on fluorspar tailings. In *Water, Air, and Soil Pollut.*, roč. 51, 1990, s. 43-54.
- DIP, R., STIEGER, C., DEPLAZES, P., HEGGLIN, D., MULLER, U., DAFFLON, O., KOCH, H., NEGELI, H., 2001. Comparison of heavy metal concentrations in tissues of red foxes from adjacent urban, suburban and rural areas. In *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, roč. 40, 2001, s. 551-556.
- DOMINO, J. L., 1994. Metal-induced development toxicity in mammals: a review. In *J. Toxicol. Environ. Health*, roč. 42, 1994, s. 123-141.
- DUDICH, A., ŠTOLLMANN, A., AMBROS, M., 1993. K poznaniu mikromamalií a ektoparazitov Ponitria. 2. Drobné zemné cicavce (*Insectivora, Rodentia*) okresu Nitra. In *Rosalia*, roč. 9, 1993, s. 209-240.
- ENLOW, D. H., BROWN, S. O., 1956. A comparative histological study of fossil and recent bone tissues. Part I. In *Texas J. Sci.*, roč. 8, 1956, s. 405-412.
- FRIBERG, L., NORDBERG, G. F., VOUK, V. B., 1986. Handbook on the Toxicology of Metals. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, 1986
- JANČOVÁ, A., MASSÁNYI, P., GÁLOVÁ, J., 2001. Ťažké kovy v parenchymatóznych orgánoch *Apodemus flavicollis* a *Clethrionomys glareolus*. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra, SPU, 2001, s. 59-61, ISBN 80-7137-916-6
- JANČOVÁ, A., MASSÁNYI, P., NAĎ, P., KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M., DRÁBEKOVÁ, J.,

- BALÁŽ, I., 2006. Accumulation of heavy metals in selected organs of yellow necked mouse (*Apodemus flavicollis*). In *Ekológia (Bratislava)*, roč. 25, 2006, s. 19-26.
- MA, W. C., DENNEMAN, W., FABER, J., 1991. Hazardous exposure of ground-living small mammals to cadmium and lead in contaminated terrestrial ecosystems. In *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, roč. 20, 1991, s. 266-270.
- MARTINIAKOVÁ, M., OMELKA, R., GROSSKOPF, B., JANČOVÁ, A., BOLEČEK, P., VONDRÁKOVÁ, M., BAUEROVÁ, M., 2006. Structure of long bones in small terrestrial mammals from different types of environment. In *Ecological Chemistry and Engineering*, roč. 7, 2006, s. 669-674.
- MARTINIAKOVÁ, M., OMELKA, R., GROSSKOPF, B., JANČOVÁ, A., STAWARZ, R., FORMICKI, G., TOMAN, R., 2008. Accumulation of xenobiotics and biogenic elements in femora of yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) from different biotopes in relationship to bone structure. In *Metal Ions in Biology and Medicine*. Paris, John Libbey Eurotext, 2008, s. 39-44.
- MARTINIAKOVÁ, M., OMELKA, R., JANČOVÁ, A., STAWARZ, R., FORMICKI, G., TOMAN, R., 2009. Accumulation of selected heavy metals in the femora of small terrestrial mammals. In *Ecological Chemistry and Engineering*, 2009 (in press).
- METCHEVA, R., TEODOROVA, S., TOPASHKANICHEVA, M., 2001. A comparative analysis of the heavy metals and toxic elements loading indicated by small mammals in different Bulgarian regions. In *Acta Zoologica Bulgarica*, roč. 53, 2001, s. 61-80.
- MILTON, A., COOKE, J. A., JOHNSON, M. S., 2003. Accumulation of lead, zinc and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. In *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, roč. 44, 2003, s. 405-411.
- MITCHELL-JONES, A. J., AMORI, G., BOGDANOWICZ, W., KRYŠTUFEK, B., REIJNDERS, P. J. H., SPITZENBERGER, F., STUBBE, M., THISEN, J. B. M., VOHRALÍK, V., ZÍMA J., 1999. Atlas of European Mammals. London, Academic Press, 1999, 495 s.
- PANKAKOSKI, E., KOIVISTO, I., HYVÄRINEN, H., 1992. Reduced developmental stability as an indicator of heavy metal pollution in the common shrew *Sorex araneus*. In *Acta Zool. Fennica*, roč. 191, 1992, s. 135-142.
- PETRUSEWICZ, K., 1983. Ecology of the bank vole. In *Acta Theriologica*, roč. 28, 1983, s. 1-242.
- RICQLÈS, A. J., MEUNIER, F. J., CASTANET, J., FRANCILLON-VIEILLOT, H., 1991. Comparative microstructure of bone. In Hall, B. K.: Bone 3, Bone Matrix and Bone Specific Products. Boca Raton, CRC Press, 1991, s. 1-78.
- ROUS, P., JELÍNEK, P., 2000. The effect of increased soil contamination with heavy metals on their content in some rabbit tissues. In *Czech. J. Anim. Sci.*, roč. 45, 2000, s. 319-324.
- SAWICKA-KAPUSTA, K., GÓRECKI, A., SWIERGOSZ, R., JUSZCZAK, G., MIELCZAREK, M., WÓJCZYK, B., 1987. Effect of metabolic rate on the rate of elimination of high and low concentrations of cadmium and lead in the bank vole. In *Ekol. Pol.*, roč. 35, 1987, s. 399-430.
- SLÁDEK, J., MOŠANSKÝ, A., 1985. Cicavce okolo nás. Martin, Osveta, 1985, 246 s.
- STAWARZ, R., ZAKRZEWSKI, M., MARENČÍK, A., HRAŠKA, Š., 2003. Heavy-metal concentration in the toad *Bufo bufo* from a region of Mochovce, Slovakia. In *Ekológia (Bratislava)*, roč. 22, 2003, s. 292-297.
- TOMAN, R., MASSÁNYI, P., TATARUCH, F., SLAMEČKA, J., JURČÍK, R., SALAGOVÁ, Z., NAĎ, P., ČUBOŇ, J., 2000. Ťažké kovy v organizme suchozemských živočíchov. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra, SPU, 2000, s. 143, ISBN 80-7137-796-1.
- VIRO, P., NIETHAMMER, J., 1982. *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780) – Rötelmaus. In NIETHAMMER, J., KRAPP, F. (eds.). Handbuch der Säugetiere Europas. Band 2/1, Rodentia II. Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden, 1982, s. 109-146.

**Pod'akovanie:**

Práca bola finančne podporená prostredníctvom projektu KEGA 3/7338/09.

**Kontaktná adresa:**

doc. RNDr. Monika Martiniaková, PhD.; doc. RNDr. Alena Jančová, PhD. Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, FPV, KZA, Nábřežie mládeže 91. Tel.: 037 6408718, Email: mmartiniakova@ukf.sk

**EFFECT OF LIFETIME LOW-DOSE EXPOSURE WITH CADMIUM DURING THREE FILIAL GENERATION OF WISTAR RATS**

*František Ništiar, Agneša Lukačínová, Robert Beňačka*

**ABSTRACT**

The aim of the present investigation was evaluate the effects of multigenerational (parental, 1<sup>st</sup> filial, and 2<sup>nd</sup> filial) exposure with lifetime low-doses of cadmium dissolved in drinking water (200-times above maximal permissible dosage) on selected physiological, reproductive, and biochemical parameters of 120 Wistar rats (20 males, 20 females in each generations). The animals were divided into 2 groups – control group, and exposed group by cadmium (20 µmol/l). Females gave births from 13<sup>th</sup> to 78<sup>th</sup> week of experiment. Parameters of reprotoxicity such as number of litters, total number of newborns (assigned in the birth day), number of newborns per litter and number of weanlings (raised young's that reached 28<sup>th</sup> day of life) were measured and compared with some toxicological, biochemical, and physiological parameters (e.g., antioxidant status, weight gain, food and water intake etc.) in 13-week intervals during 156 week in each of three generation. Our data show consecutive conditioning of more of assessment parameters during our experiment. This phenomenon is like to hormesis.

**Keywords:** low-dose exposure, cadmium, reprotoxicity, oxidative stress, hormesis

**INTRODUCTION**

Contamination of water, air, and food by numerous chemicals and non-essential elements, such as heavy metals, is an unfortunate byproduct of a complex, industrialized, high-tech society. Heavy metal poisoning and chemical toxicity leads to the accumulation of toxins in our tissues and organs causing nutritional deficiencies, hormonal imbalances, neurological disorders, and can even lead to autoimmune disorders, cancer, and other debilitating chronic conditions (Massányi et al., 2004). Heavy metal intoxication is a new public health threat in the present day (Archibald, 2009; Doak et al., 2009).

Cadmium (Cd) is an important inorganic toxicant widely distributed in the environment. This heavy metal is non-biodegradable, and the environmental levels of Cd are increasing as a result of industrial practices, as well as a contaminant of fertilizers (Goering et al., 1995; Jarup et al., 1998). Cd toxicity is very dependent on the dose, duration, and route of exposure (Massányi et al., 1995; Lukačínová et al., 2008). Acute Cd administration produces hepatic injury, pulmonary edema, and testicular damage, while chronic exposure results in renal dysfunction, osteomalacia, and cancer in multiple organs (Goering et al., 1995; Waalkes and Misra, 1996).

Cadmium, as well as lead and mercury, can interact metabolically with nutritionally essential metals. Cadmium interacts with calcium in the skeletal system to produce osteodystrophies, and competes with zinc for binding sites on metallothionein, which is important in the storage and transport of zinc during development (Nad' et al., 2005, 2007). Biliary excretion seems to be an essential factor for the fecal elimination of cadmium, although this metal may be also excreted in the urine.

The degree of cadmium contamination in wildlife can be used as an indicator for the environmental monitoring of cadmium poisoning (Mochizuki et al., 2008). For example, wild pigeons were mentioned as a specific medium of monitoring for evaluation of cadmium pollution in some urban areas (Ortowski, 1996). The best situation of environmental cadmium intoxication in the global record is in Japan, namely Itai-Itai. Cases were first recorded from as early as 1929, increased rapidly to the peak in 1955-1959 and rapidly decreased up to the 1970s, and it was found that the later the patient was born, the younger was the age of onset, although there was no difference of ages of onset between the cases born in the 1910s and those born in 1920 (Mochizuki et al., 2008). Cadmium concentrations in blood and urine are significantly higher in the Itai-Itai disease patients, suspected patients and inhabitants of cadmium-polluted areas (Nogawa a Kido, 1993). Uetani et al. (2006) studied tissue cadmium concentrations of people living in a cadmium-polluted area in Japan. Uetani et al. (2006) demonstrated that the tissue cadmium concentrations of some inhabitants in cadmium-polluted areas other than the Jinzu river basin were equal to those of the patients with Itai-Itai disease, and that patients with Itai-Itai disease were present even in these areas. Of interest, in spite of the fact that environmental monitoring did not reveal a significant contamination of the selected areas by cadmium, the urine cadmium levels confirmed that the

population living in these areas is really exposed to cadmium (Cikrt et al., 1992). A significant association was detected between urinary beta 2-microglobulin and mortality in a 9-year follow-up study of 3178 cadmium-exposed inhabitants using Cox's proportional hazards model (Kido, 1995). Liu (1999) recently studied cadmium concentrations in hair, urine and blood among residents in a cadmium-polluted area on an 18-year follow-up after soil replacement. According to this work, it was suggested that the body burden influenced the levels of blood cadmium as well as urine cadmium many years after cadmium exposure had decreased (Liu, 1999).

Most of the total body burden of Cd in animals and humans is associated with metallothionein (MT) (Goering et al., 1995). MT is a small protein, and one-third of its amino acid residues are cysteines. These cysteine residues bind and store metal ions, and play an important role in Cd detoxication (Klaassen et al., 1999). Wistar rats are low susceptible than Sprague Dawley rats to Cd toxicity following chronic exposure in drinking water, indicating the importance of MT in protecting against Cd toxicity among various strains of rats. However, because food is the main source of Cd exposure for the general human population, the effects observed following chronic exposure with low level of Cd in drinking water in animals might very reliable model oral exposures in humans. Furthermore, there are contradictory reports in regard to the inhibitory role of MT in Cd absorption from the intestine (Rajan et al., 1999). It is also known that the Cd-MT complex, when isolated and injected into animals, is highly nephrotoxic, indicating that MT may play a key role in the causation of Cd nephropathy. The precise role of MT in either prevention or causation of chronic Cd-induced renal toxicity after oral exposure has not been established.

The purpose of the present study is to elucidate the significance of physiological, toxicological, and biochemical findings which are observed in animals with lifetime low-level exposure with cadmium in drinking water by comparing these findings and reprotoxicity parameters.

**MATERIALS AND METHODS**

CdCl<sub>2</sub> was obtained from Lachema (Czech Republic), ingredients for biochemical kits were purchased from DOT-Diagnostics (Czech Republic), and Randox Laboratory (UK). All other chemicals were of reagent grade.

Outbred Wistar albino-rats (40; 20 females and 20 males, age 4 weeks, average weight 118±9 g) and their 28-days old newborns (older young's were transferred into another experiment). The females and males were kept in couples in separate cages with free access to water (without and with cadmium) and food and light/dark cycle 12:12 hours at 22 ± 1°C during 156 weeks. The experiment was terminated on 156<sup>th</sup> week. Experiments were performed in Central animal facility of the Medical faculty with accreditation for laboratory animal breeding. The experiments were approved by local Ethical Committee and the State Veterinary Agency (No. Ro-7879/04-220/3). The animals were divided randomly into 2 groups (10 females and 10 males in each). Always 1 female and 1

Fig 1 - Survival (%) of rats

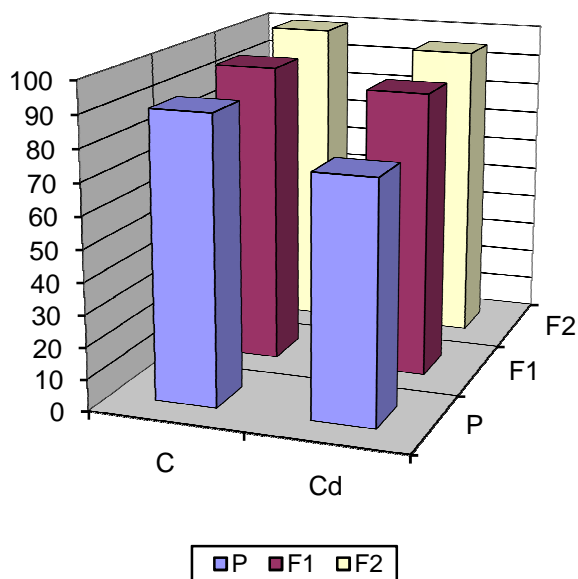
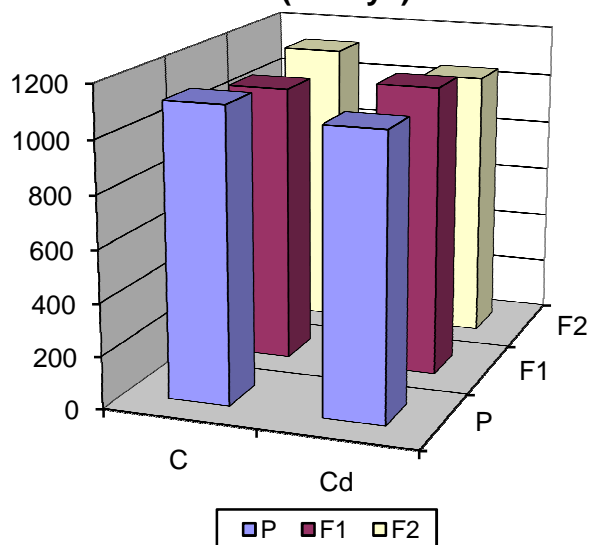


Fig 2 - Mean life span (in days)



male was kept in separate cage. While control rats (group C, n = 20) did not received any additives into the tap water, against rats in experimental group (group Cd, n = 20) which were given cadmium-containing compound (CdCl<sub>2</sub> at concentration 20 μmol/l, contains 2 mg of cadmium/l) diluted in tap water in amounts such that the cadmium content was 200 – times higher than maximal allowed concentration in drinking water (MAC).

Tab. 1 Number of litters/number of newborns/number of weanlings

Group	P	F1	F2
C	98/754/686	99/766/698	96/751/676
Cd	90/706/606	95/752/677	97/755/695

Parameters of reprotoxicity such as number of litters, total number of newborns (assigned in the birth day), number of newborns per litter and number of weanlings (raised young's that reached the 28<sup>th</sup> day of life) were measured during the reproductive cycle from 13<sup>th</sup> to 78<sup>th</sup> week.

The weight gain, food and water intake were determined daily in the morning. Blood samples was collected through the rat tail vein in morning and was centrifuged at 1 000 g for 10 min. Plasma was separated and buffy coat was discarded by aspiration. Erythrocytes were washed three times with cold physiological saline and stored at -20°C until analysis.

Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities of erythrocytes were estimated for the haemolysates by the use of commercially available kits (Randox Laboratory, UK). Erythrocyte catalase (CAT) activity was determined by the method of Aebi (1984) by using UV/visible spectrophotometer at 240 nm. Whole blood glutathione (GSH) concentration was determined by using the method described by Beutler et al. (1963). TAS was measured using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay (Randox Laboratory, UK), a method developed by Miller et al. (1993).

Data were expressed as mean±S.D. For statistical evaluations of significant differences pair- and unpaired t-test were used in combination with Wilcox-Mann-

Whitney´ U-test (Stat graphic) or one-way ANOVA supplemented by Newman-Keuls post-hoc test. The dates were considered significant if P<0.05.

### RESULTS AND DISCUSSION

Lifetime oral consumption low-concentration of Cd in drinking water (20 μmol/l) had no apparent effect on toxicological parameters (e.g. average daily doses, lifetime average daily doses, common ratio of LD<sub>50</sub>); body-weight gain, feed consumption and water intake, but were low differences in survival of animals (Fig 1 and 2).

Selected reproduction parameters are presented in Tab. 1. While in control group were not significant variances among three generations, in groups lifetime exposed with low-dose Cd were these parameters improved in each subsequent filial generation, and in F2 filial generation were better as in control group. These results are very similar to phenomenon described by Calabrese and co-workers (Calabrese and Baldwin, 1998; 2003) as chemical hormesis (Calabrese and Blain, 2005; Cook and Calabrese, 2006).

These finding are important, because oral intake is a primary concern in human Cd exposure, particularly of the general population, and present day exposure levels appear to carry a significant risk, predominantly for reproductive disorders (Massányi et al., 2004; Åkesson et al., 2008) and renal damage (Manna et al., 2009). It is well known that the toxic effects of Cd are dependent on the dose, route, and duration of Cd exposure. In general, Cd given via the oral route is much less toxic than when given parenterally, primarily because Cd is poorly absorbed from the gastrointestinal tract. Only about 0.5–3% of ingested Cd is absorbed from the gastrointestinal tract (Patterson et al., 2008). The intestinal absorption of Cd is also affected by many factors, and the role of intestinal MT in Cd absorption is an issue of debate. Intestinal MT has been to limit intestinal Cd absorption (Roesijadi et al., 2009).

However, a wide spectrum of deleterious effects on the reproductive tissues and the developing embryo has also been described. In the testis, changes due to disruption of

the blood-testis barrier and oxidative stress have been noted, with onset of widespread necrosis at higher dosage exposures. Incorporation of Cd into the chromatin of the developing gamete has also been demonstrated (Thompson and Bannigan, 2008). Ovarian Cd concentration increases with age, and has been associated with failure of progression of oocyte development from primary to secondary stage, and failure to ovulate. A further mechanism by which ovulation could be rendered ineffective is by failure of pick-up of the oocyte by the tubal cilia due to suboptimal expansion of the oocyte-cumulus complex and mis-expression of cell adhesion molecules (Fowler et al., 2008). Retardation of trophoblastic outgrowth and development, placental necrosis and suppression of steroid biosynthesis, and altered handling of nutrient metals by the placenta all contribute to implantation delay and possible early pregnancy loss. Cd has been shown to accumulate in embryos from the four-cell stage onwards, and higher dosage exposure inhibits progression to the blastocyst stage, and can cause degeneration and decompaction in blastocysts following formation, with apoptosis and breakdown in cell adhesion. Following implantation, exposure of experimental animals to oral or parenteral Cd causes a wide range of abnormalities in the embryo, depending on the stage of exposure and dose given. Craniofacial, neurological, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinary, and limb anomalies have all been described in placentates, with axial abnormalities and defects in somite structure noted in fish and ventral body wall defect and vertebral malformation occurring in the chick

resonance spectra, which are often accompanied by activation of redox sensitive transcription factors (e.g., NF-κB, AP-1 and Nrf2) and alteration of ROS-related gene expression. It is generally agreed upon that oxidative stress plays important roles in acute Cd poisoning (Valko et al., 2005; Liu et al., 2009). However, following long-term Cd exposure at environmentally-relevant low levels, direct evidence for oxidative stress is often obscure. Alterations in ROS-related gene expression during chronic exposures are also less significant compared to acute Cd poisoning. This is probably due to induced adaptation mechanisms (e.g., metallothionein and glutathione) following chronic Cd exposures, which in turn diminish Cd-induced oxidative stress. In chronic Cd-transformed cells, less ROS signals are detected with fluorescence probes. Acquired apoptotic tolerance renders damaged cells to proliferate with inherent oxidative DNA lesions, potentially leading to tumor genesis (Liu et al., 2009). Thus, ROS are generated following acute Cd overload and plays important roles in tissue damage. Adaptation to chronic Cd exposure reduces ROS production, but acquired Cd tolerance with aberrant gene expression plays important roles in chronic Cd toxicity and carcinogenesis.

### CONCLUSION

Cadmium (Cd) is a very harmful environmental pollutant that transfers between various levels of the food chain (Lalor, 2008). In conclusion, the present study confirms that lifetime oral low-dose Cd administration via drinking water produces phenomenon when is very similar to hormesis (Calabrese, 2008). Exposure of human populations to Cd from air, food and water may produce effects in organs such as the kidneys, liver, lungs, cardiovascular, immune and reproductive systems. Since Cd has been identified as a human carcinogen, biomarkers for early detection of susceptibility to cancer are of an importance to public health. The ability to document Cd exposure and uptake of this element through biological monitoring is a first step towards understanding its health effects. Interpretation and application of biological monitoring data for predicting human health outcomes require correlation with biological measures of organ system responses to the documented exposure. Essential to this understanding is the detection and linkage of early biological responses toxic effects in target cell populations. Fortunately, advances in cell biology have resulted in the development of pre-clinical biological markers (biomarkers) that demonstrate measurable and characteristic molecular changes in organ systems following chemical exposures that occur prior to the onset of overt clinical disease or development of cancer. Technical advances have rendered a number of these biomarkers practical for monitoring Cd-exposed human populations. Biomarkers will be increasingly important in relation to monitoring effects from the exposure to new Cd-based high-technology materials. For example, cadmium-selenium (CdSe), nano-materials made from combinations of these elements may have greatly altered cellular uptake characteristics due to particle size. These

Tab. 2 Antioxidant status in rats (P/F1/F2)

Parameter	C	Cd
SOD U/mg hemoglobin	15,7/15,2/16,0	4,3/8,2/10,9
GPx U/mg hemoglobin	24,1/25,3/25,0	14,8/18,7/22,2
CAT mmol/mg hemoglobin	1,61/1,55/1,58	1,22/1,11/1,34
GSH μmol/l	26,9/22,3/25,1	31,6/32,8/31,7
TAS mmol/l	1,22/1,25/1,23	1,48/1,55/1,67

(Schutte et al., 2008).

Effects of lifetime exposure with low-dose Cd on parameters of antioxidant defense of rats are presented in Tab. 2.

Exposure to Cd lowered SOD, GPx, CAT activities, and paradoxically enhanced GSH and TAS. From generation to generation were all parameters of antioxidant status better. Exposure to Cd lowered total SOD, CuZn SOD, GPx and CAT activities, while it increased MDA level and the ratio of CuZn SOD to GPx activity, in liver and kidney (Jihen et al., 2008). Cd cause in chronic intoxication predominantly nephrotoxicity, immunotoxicity, osteotoxicity and tumors (Liu et al., 2009). Reactive oxygen species (ROS) are often implicated in Cd toxicology. The generation of free radicals in intact animals following acute Cd overloads and discussed the association of ROS in chronic Cd toxicity and carcinogenesis (Valko et al., 2005). Cd-generated superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals in vivo have been detected by the electron spin

differences may greatly alter effects at the target cell level and hence risks for organ toxicities from such exposures. The value of validated biomarkers for early detection of systemic Cd-induced effects in humans cannot be underestimated due to the rapid expansion of nano-material technologies.

We believe that this initial study may provide a fertile ground for more detailed studies of the long-term effects of low-dose exposure to heavy metals and other toxins for the estimation of possible risks and preparation of the effective measures for their prevention.

## REFERENCES

AEBI, H. 1984. Catalase in vitro. In: *Methods Enzymol.*, vol. 105, 1984, p. 121-126.

ÅKESSON, A., JULIN, B., WOLK, A. 2008. Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: A population-based prospective cohort study. In: *Cancer Res.*, vol. 68, 2008, p. 6435-6441.

ARCHIBALD, J. M. 2009. Genomics: Green evolution, green revolution. In: *Science*, vol. 324, 2009, p. 191-192.

BEUTLER, E., DURON, O., KELLY, B. M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. In: *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 61, 1963, p. 882-888.

CALABRESE, E. J. 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. In: *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 27, 2008, p. 1451-1474.

CALABRESE, E. J., BALDWIN, L. A. 1998. Hormesis as a biological hypothesis. In: *Environ. Health Perspect.*, vol. 106, 1998, p. 357-362.

CALABRESE, E. J., BALDWIN, L. A. 2003. Hormesis: dose-response revolution. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 43, 2003, p. 175-197.

CALABRESE, E. J., BLAIN, R. 2005. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 202, 2005, p. 289-301.

CIKRT, M., TICHÝ, M., BLAHA, K., BITTNEROVA, D., HAVRDOVA, J., LEPSI, P., SPERLINGOVA, I., NEMECEK, R., ROTH, Z., VIT, M. 1992. The study of exposure to cadmium in the general population: II. Morbidity studies. In: *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health*, vol. 5, 1992, p. 345-356.

COOK, R., CALABRESE, E. J., 2006. The importance of hormesis to public health. In: *Environ. Health Perspect.*, vol. 114, 2006, p. 1631-1635.

DOAK, S. H., GRIFFITHS, S. M., MANSHIAN, B., SINGH, N., WILLIAMS, P. M., BROWN, A. P., JENKINS, G. J. S. 2009. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. In: *Mutagenesis*, vol. 10, 2009, 10.1093/mutage/geb010.

FOWLER, P. A., DORÀ, N. J., McFERRAN, N., AMEZAGA, M. R., MILLER, D. W., LEA, R. G., CASH, P., McNEILLY, A. S., EVANS, N. P., COTINOT, C., SHARPE, R. M., RHIND, S. M. 2008. In utero exposure to low doses of environmental pollutants disrupts fetal ovarian development in sheep. In: *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 14, 2008, p. 269-280.

GOERING, P. L., WAALKES, M. P., KLAASSEN, C. D. 1995. Toxicology of cadmium. In: GOYER, R. A., GHERIAN, M. G.: *Toxicology of Metals: Biochemical Aspects. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 115*, New York, Springer-Verlag, 1997, p. 189-213.

JARUP, L., BERGLUND, M., ELINDER, C. G., NORDBERG, G., VAHTER, M. 1998. Health effects of cadmium exposure: A review of the literature and a risk estimate. In: *Scand. J. Work Environ. Health*, vol. 24(Suppl. 1), 1998, p.1-51.

JIHEN, E. H., IMED, M., FATIMA, H., ABDELHAMID, K. 2008. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: histology and Cd accumulation. In: *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, 2008, p. 3522-3527.

KIDO, T. 1995. Studies on health effects of cadmium exposure in the general environment. In: *Nippon Eiseigaku Zasshi*, vol. 49, 1995, p. 960-972.

KLAASSEN, C. D., LIU, J., CHOUDHURI, S. (1999). Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, 1999, p. 267-294.

LALOR, G.,C. 2008. Review of cadmium transfers from soil to humans and its health effects and Jamaican environment. In: *Sci Total Environ*, vol. 400, 2008, p. 162-172.

LIU, J., QU, W., KADIISKA, M. B. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Feb 2009, in press.

LIU, X. J. 1999. Cadmium concentrations in hair, urine and blood among residents in a cadmium-polluted area, Nagasaki, Japan: A 18-year follow-up after soil replacement. In: *Nippon Eiseigaku Zasshi*, vol. 54, 1999, p. 544-551.

LUKAČÍNOVÁ, A., BEŇÁČKA, R., LOVÁSOVÁ, E., RÁČZ, O., NIŠTIAR, F. 2008. Reproduction parameters in low dose chronic exposure with heavy metals in rats. In: *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 17, 2008, p. 911-915.

MANNA, P., SINHA, M., SIL, P. C. 2009. Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. In: *Amino Acids*, vol. 36, 2009, p. 417-428.

MASSÁNYI, P., TOMAN, R., VALENT, M., ČUPKA, P. 1995: Evaluation of selected parameters of a metabolic profile and levels of cadmium in reproductive organs of rabbits after an experimental administration. In: *Acta Physiol. Hung.*, vol. 83, 1995, p. 267-273.

MASSÁNYI, P., TOMAN, R., UHRÍN, V., RENON, P. 2004. Distribution of cadmium in selected organs of rabbits after an acute and chronic administration. In: *Ital. J. Food Sci.*, vol. 3, 2004, p. 311-316.

MILLER, N. J., RICE EVANS, C., DAVIES, M. J., GOPINATHAN, V., MILNER, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. In: *Clin. Sci. Colch.*, vol. 84, 1993, p. 407-412.

MOCHIZUKI, M., MORI, M., HONDO, R., UEDA, F. 2008. A new index for evaluation of cadmium pollution in birds and mammals. In: *Environ. Monit. Assess.*, vol. 137, 2008, p. 35-49.

NAĎ, P., MASSÁNYI, P., SKALICKÁ, M., KORÉNEKOVÁ, B., CIGÁNKOVÁ, V., ALMÁŠIOVÁ, V. 2007. The effect of cadmium in combination with zinc and selenium on ovaria structure in Japanese quails. In: *J. Environ. Sci. Health A*, vol. 42, 2007, p. 2017-2022.

NAĎ, P., SKALICKÁ, M., KORÉNEKOVÁ, B., PISTL, J., CIGÁNKOVÁ, V. 2005. Vplyv expozície vyšších dávok kadmia v interakcii so zinkom na zdravie moriek a zdravotnú nezávadnosť produktov. [Effect of exposure with highest doses of cadmium in interaction with zinc on the welfare of turkeys and health safety of their products]. In: *Risk factors of food chain*, Nitra, 2005, p.248-251.



- NOGAWA, K., KIDO, T. 1993. Biological monitoring of cadmium exposure in itai-itai disease epidemiology. In: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 65, 1993, p. S43-46.
- ORTOWSKI C. 1996. Wild pigeons (*Columbia livia*, forma urbana) as a medium of monitoring for evaluation of cadmium pollution in urban areas. In: *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, vol. 47, 1996, p. 389-394.
- PATTERSON, J. K., LEI, X. G., MILLER, D. D. 2008. The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. In: *Exp. Biol. Med.*, vol. 233, 2008, p. 651-664.
- RAJAN, S. S., WILSON, A. K., BHATTACHARYYA, M. H. (1999). Role of metallothionein in the uptake and distribution of environmental levels of cadmium in mice. In: *Toxicol. Sci.*, vol. 48(Suppl.), 1999, p. A1385.
- ROESIJADI, G., REZVANKHAH, S., PEREZ-MATUS, A. – MITELBERG, A. – TORRUELLAS, K., VAN VELD, P. A. 2009. Dietary cadmium and benzo(a)pyrene increased intestinal metallothionein expression in the fish *Fundulus heteroclitus*. In: *Mar. Environ. Res.*, vol. 67, 2009, p. 25-30.
- SCHUTTE, R., NAWROT, T., RICHART, T., THIJS, L., ROELS, H. A., VAN BORTEL, L. M., STRUIJKER-BOUDIER, H., STAESSEN J. A. 2008. Arterial structure and function and environmental exposure to cadmium. In: *Occup. Environ. Med.*, vol. 65, 2008, p. 412-419.
- THOMPSON, J., BANNIGAN, J. 2008. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. In: *Reprod. Toxicol.*, vol. 25, 2008, p. 304-315.
- UETANI, M., KOBAYASHI, E., SUWAZONO, Y., HONDA, R., NISHIJO, M., NAKAGAWA, H., KIDO, T., NOGAWA, K. 2006. Tissue cadmium (Cd) concentrations of people living in a Cd polluted area, Japan. In: *Biometals*, vol. 19, 2006, p. 521-525.
- VALKO, M., MORRIS, H., CRONIN, M. T. D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. In: *Curr. Med. Chem.*, vol. 12, 2005, p. 1161-1208.
- WAALKES, M. P., MISRA, R. R. 1996. Cadmium carcinogenicity and genotoxicity. In: CHANG, L.: *Toxicology of Metals*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, p. 231-244.

### Acknowledgment:

This research was supported in part by Slovak VEGA Grant Agency (Reg. No. 1/8235/01 and 1/3494/06)

### Contact address:

prof. MVDr. František Ništiar, CSc., Institute of Pathological Physiology, Faculty of Medicine UPJS, Trieda SNP 1, 040 66 Košice, Slovak Republic, E-mail: Frantisek.Nistiar@upjs.sk

## VPLYV RÔZNYCH KONCENTRÁCIÍ ZINKU A KADMIA NA LETALITU ARTEMIA FRANCISCANA

## THE INFLUENCE OF VARIOUS CONCENTRATIONS OF ZINC AND CADMIUM TO LETHALITY OF ARTEMIA FRANCISCANA

Jaroslava Nováková, Iveta Cimboláková

### ABSTRACT

From various toxic elements the heavy metals, particularly cadmium, lead, mercury and zinc, occur frequently in the environment following their relatively high industrial use. While the toxicity of individual substances is usually well known, data about their mutual interactions are relatively scarce. There is a prevailing trend to substitute the higher vertebrates in experiment with alternative biotests of the 2<sup>nd</sup> generation, as *Artemia franciscana*. Our study is focused on the effect of zinc sulphate and cadmium chloride combinations on the model organism *Artemia franciscana* lethality. The aim of the study was to observe synergistic or antagonistic effects of these two metals.

Cadmium may increase or decrease the toxicity of zinc in concentration depending manner. Cadmium at concentrations exceeding 100 mg.l<sup>-1</sup> effects synergistically on toxic effect in combination with zinc. Our observations allowed us to conclude that the use of low concentrations of cadmium (up to 50 mg.l<sup>-1</sup>) significantly decreased lethality to *Artemia franciscana* caused by zinc at concentration 100 mg.l<sup>-1</sup>.

**Keywords:** *Artemia franciscana*, crustacean, cadmium, lethality, nauplii, zinc

### ÚVOD

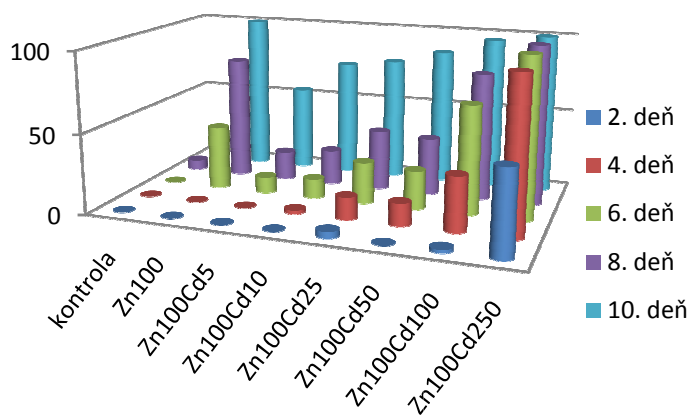
Zvyšovaním intenzifikácie priemyslu narastá výskyt toxických zložiek v životnom prostredí, čo vedie ku kontinuálnej expozícii ľudí a zvierat. To má za následok zvýšený záujem o štúdium dôsledkov pôsobenia xenobiotík vrátane ťažkých kovov na živé organizmy (Beyer et al., 2005; Obi et al., 2006; Žáková et al., 2006). Z toxických prvkov sú ťažké kovy, hlavne kadmium, olovo, ortuť a zinok najvýznamnejšie, najmä pre svoju perzistenciu v potravinovom reťazci a následné ohrozenie zvierat a človeka.

Z hľadiska sledovania znečistenia vodného prostredia bolo potrebné zamerať pozornosť na výskum vodného planktónu. Ide o sledovanie priameho znečistenia vodného prostredia, t. j. účinok polutantov na planktón a jeho organizmus (mikrofaunu a mikroflóru) ako aj sledovanie

kumulácie toxických látok v planktóne, nakoľko planktón sa nachádza na východiskových spodných stupňoch potravinového reťazca. V tomto ohľade sa javí *Artemia franciscana* ako vhodný a perspektívny modelový objekt (Libralato, Losso a Ghirardini, 2007; Koutsaftis a Aoyama, 2008), aj keď sú známe aj mnohé iné, najmä jednobunkové testovacie objekty (Lukačínová et al., 2007).

### MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité *Artemia franciscana* vyliahnuté v morskej vode (tabuľka 1) (Dvořák, Šucman a Beňová, 2005). 10 ks čerstvo vyliahnutých nauplií sme umiestnili do polystyrénových Petriho misiek o priemere 60 mm pri celkovom objeme morskej vody 10 ml vrátane vzorky, s prídavkom glukózy ako zdroja potravy pre A.



**Graf 1** Vplyv kombinácie rôznych koncentrácií síranu zinočnatého a chloridu kadmnatého na letalitu *Artemia franciscana* (%)

**Tabuľka 1** Zloženie „morskej“ vody používanej k liahnutiu a pokusom na *Artemia franciscana* (Dvořák, Šucman a Beňová, 2005)

Látka	Koncentrácia (g.l <sup>-1</sup> )
NaCl	23,9
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,83
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,25
KCl	0,68
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .10H <sub>2</sub> O	9,06
NaHCO <sub>3</sub>	0,2
SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,04
KBr	0,099
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,027
glukóza	30,0

*franciscana*. V pokuse boli použité zlúčeniny chloridu kadmnatého (CdCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) o koncentracii kadmia 5, 10, 15, 25, 50, 100 a 250 mg.l<sup>-1</sup> a síranu zinočnatého (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) o koncentracii zinku 100 mg.l<sup>-1</sup>. Všetky skúmané zlúčeniny roztoky boli riedené v morskej vode. Na základe koncentrácií bolo vytvorených 13 pokusných skupín a jedna kontrolná skupina (čistá morská voda). Pre každú koncentráciu bolo zaradených 50 jedincov, ktorí boli rozdelení do 5 samostatných skupín (misiiek) po 10 jedincoch. V experimente bolo celkovo použitých 700 jedincov. Petriho misky boli umiestnené pri teplote 20 ± 1°C. Počas 10 dní trvania testu boli odčítané živé *A. franciscana* v 24-hodinových intervaloch. Odčítal sa počet žijúcich artemií vyhodnotením ich pohybu v miske na čiernom podklade. Za uhynuté naupliové štádiá pre túto metodiku boli považované jedince, ktoré nevykazovali pohyb žiadnej časti tela ani po podráždení spôsobenom krúživým pohybom roztoku v miske (v sporných prípadoch posudzované pomocou stereolupy). Na vyhodnotenie výsledkov sme použili Deanov – Dixonov test (Dvořák a Šucman, 1995). Signifikancia medzi jednotlivými skupinami bola testovaná podľa

Waylanda a Hayes (1991). Pre hodnotiteľnosť testu bola dodržaná podmienka úhynu kontrol do 20% v priebehu 240 hodín (Dvořák et al., 2005).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

K významnému zvýšeniu letality oproti kontrolnej skupine (Zn 100) došlo na 4. deň u kombinácie Zn100Cd10, na 4. deň u kombinácie Zn100Cd50, na 3. až 6. deň u kombinácie Zn100Cd100 a na 2. až 8. deň u kombinácie Zn100Cd250. K významnému zníženiu letality oproti kontrolnej skupine (Zn 100) došlo na 5. až 10. deň u kombinácie Zn100Cd5, na 7. až 10. deň u kombinácie Zn100Cd10, na 5. až 10. deň u kombinácie Zn100Cd25 a na 7. až 10. deň u kombinácie Zn100Cd50.

Ostatné výsledky neboli štatisticky významné. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2 a grafe 1.

Zinok je v organizme nezastupiteľný ako mikroelement a súčasť niektorých enzýmov. Do životného prostredia sa dostáva cez odpadové vody pri spracovaní rúd, pri výrobe zliatin, gumárenstve, pri výrobe farieb atď. Otravy sú zriedkavé a vyskytujú sa ako ojedinelé prípady. Cestou vstupu je ingescia a inhalácia. Kadmium patrí k ťažkým kovom distribuovaným do prostredia. Zdroje kontaminácie sú rôzne a široké od spracovania rúd, automobilového priemyslu až po poľnohospodárstvo (ako kontaminant fosforečných hnojív).

Exhaláty kadmia sa hromadia vo vode a pôde. Po vstupe do organizmu je transportovaný do pečene, obličiek, črevnej sliznice a ostatných tkanív. Viaže sa na plazmatické bielkoviny, erytrocyty a metalothioneín. Po prekročení väzobnej kapacity metalothioneínu dochádza k reverzibilným a ireverzibilným zmenám spôsobeným voľnými iónmi kadmia. Výrazne znižuje aktivitu antioxidantných obranných systémov, následne aj antioxidantnú kapacitu organizmu (Lovásová et al., 2002; Hijová a Ništiar, 2005). Primárnym miestom ich zásahu sú bunkové membrány. Dochádza k patologickým zmenám najmä v pečeni, obličkách, ďalej v semenníkoch, ováriách, k imunosupresii, karcinogéze, hypochrómnej mikrocytarnej anémii, inhibícii aktivity mnohých enzýmov atď. Kadmium je biologický antagonist medi, zinku, selénu a železa.

Zinok a kadmium sa v organizme nevyskytujú vo forme voľných iónov, ale sú viazané na metalothioneín - intracelulárny nízkomolekulárny proteín bohatý na cysteín. Až po vyčerpaní väzobných miest na tomto proteíne sa kovy dostávajú do krvi a vyvolávajú otravy. Nízke dávky kadmia stimulujú syntézu metalothioneínu už po niekoľkých hodinách, čím sa zvyšuje väzobná kapacita pre ťažké kovy (Barata et al., 2002; Trinchella et al., 2006). Ak sa nenasytetizuje dostatok metalothioneínu vplyv zinku na prevenciu toxicity kadmia sa neprejaví (Hua et al., 2002; Martinez et al., 1999). Na finálnom efekte môže mať podiel aj toxikologická horméza (Calabrese a Blain, 2005; Beňová et al., 2007).

### ZÁVER

Súčasná aplikácia vysokých dávok kadmia a zinku do vody s *Artemia franciscana* má synergický účinok. Je to následok konkurencie týchto kovov o terčové molekuly.

**Tabuľka 2** Letalita *Artemia franciscana* (%) pôsobením interakcie chloridu kadmnatého ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a síranu zinočnatého ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Čas (h)	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
kontrola	0	0	0	0	0	0	6	6	6	8
Cd5	0	0	0	0	0	2	18	18	20	24
Cd10	0	0	0	0	4	10	16	16	24	56
Cd25	0	0	0	0	0	2	28	36	50	80
Cd50	0	2	4	6	14	50	58	68	76	86
Cd100	0	2	18	24	32	80	94	98	100	100
Cd250	0	6	22	62	78	96	98	100	100	100
Zn100	0+	0+	0+	0+	22+	40+	70+	78+	88+	100+
Zn100Cd5	0	0	0	0	0*	10*	10*	18*	42*	54*
Zn100Cd10	0	0	2	2	6*	12*	16*	22*	56*	74*
Zn100Cd25	0	4	10	14*	14	26	26*	38*	66*	78*
Zn100Cd50	0	0	10	14*	14	24	28*	36*	70*	86*
Zn100Cd100	0	2	26*	34*	40*	68*	76	80	92	96
Zn100Cd250	0	52*	96*	96*	98*	100*	100*	100*	100	100

(+\*) - rozdiely medzi takto označenými hodnotami boli signifikantné ( $\alpha = 0.05$ )

Oproti tomu podanie nízkych dávok kadmia vedie k významnému zníženiu letálneho účinku zinku na artemie. Samotná aplikácia nízkych dávok kadmia môže mať dokonca stimulačný účinok na rast artemií.

## LITERATÚRA

- BARATA, C., MARKICH, S. J., BAIRD, D. J., TAYLOR, G., SOARES, A. M., V. M., 2002. Genetic variability in sublethal tolerance to mixtures of cadmium and zinc in clones of *Daphnia magna* Straus. In *Aquatic Toxicology*, roč. 60, 2002, č. 1-2, s. 85-99
- BEŇOVÁ, K., DVOŘÁK, P., FALIS, M., SKLENÁŘ, Z., 2007. Interaction of low doses of ionizing radiation, potassium dichromate and cadmium chloride in *Artemia franciscana* a biotest. *Acta Vet. Brno*, roč. 76, 2007, č. 1, s. 35-40
- BEYER, W. N., DALGAM, J., DUDDING, S., FRENCH, J. B., MATEO, R., MIESNER, J., SILEO, L., SPANN, J., 2005. Zinc and lead poisoning in wild birds in the Tri-State Mining District (Oklahoma, Kansas, and Missouri). In *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, roč. 48, 2005, s. 108-117
- CALABRESE, E. J., BLAIN, R., 2005. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. In *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, roč. 202, 2005, s. 289-301
- DVOŘÁK, P., ŠUCMAN, E., BEŇOVÁ, K., 2005. The development of a ten-day biotest using *Artemia salina* nauplii. In *Biologia*, roč. 60, 2005, č. 5, s. 593-597
- DVOŘÁK, P., ŠUCMAN, E., 1995. Statistika ke cvičením z biofyziky. Ústav biochémie a biofyziky FVH VFU: Brno 1995, s. 13
- HIJOVÁ, E., NIŠTIAR, F., 2005. Vitamín C a kadmium, In *Rizikové faktory potravinového reťazca V*, Nitra, ISBN 80-8069-594-6, Nitra, 2005, s. 91-93
- HUA, L., BAY, L., WEI, D. P., CHEN, S. B., 2002. Effects of interaction by organic manure-Cd-Zn on Cd, Zn formation in soil and wheat growth. In *China Envir. Science*, roč. 22, 2002, s. 346-350
- KOUTSAFTIS, A., AOYAMA, I., 2008. Toxicity of Diuron and copper pyrithione on the brine shrimp, *Artemia*

*franciscana*: the effects of temperature and salinity. In *J Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, roč. 43, 2008, č. 14, s. 1581-1585

LIBRALATO, G., LOSSO, C., GHIRARDINI, A. V., 2007: Toxicity of untreated wood leachates towards two saltwater organisms (*Crassostrea gigas* and *Artemia franciscana*). In *J. Hazard Mater.*, roč. 144, 2007, č. 1-2, s. 590-593

LOVÁSOVÁ, E., ŠIPULOVÁ, A., NIŠTIAR, F., RÁČZ, F.

O., 2002. The effect of chronic cadmium and mercury exposure on the plasma total antioxidant status in rats. In *Folia Veterinaria*, roč. 46, 2002, č. 2, s. 61-64

LUKAČINOVÁ, A., MOJŽIŠ, J., BEŇAČKA, R., LOVÁSOVÁ, E., HIJOVÁ, E., NIŠTIAR, F., 2007. *Tetrahymena pyriformis* as a valuable unicellular animal model organism for determination of xenobiotics. In: *Industrial Toxicology 2007: 27th International Symposium*, May 30 - June 1, 2007, Bratislava, Slovak Republic. Bratislava, ISBN 978-80-227-2654-2, 2007, s. 361-366

MARTINEZ, M., DEL RAMO, J., TORREBLANCA, A., DIAZ-MAYANS, J., 1999 Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. In *Aquaculture*, roč. 172, 1999, s. 315-325

OBI, E., AKUNYILII, D. N., EKPO, B., ORISAKWE, O. E., 2006. Heavy metal hazards of Nigerian herbal remedies, In *Sci. Total. Environ.*, roč. 369, 2006, s. 35-41

TRINCHELLA, F., RIGGIO, M., FILOSA, S., VOLPE, M. G., PARISI, E., SCUDIERO, R., 2006. Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. In *Comp. Biochem. Physiol., C-Toxicol. Pharmacol.*, roč. 144, 2006, s. 272-278

WAYLAND, J., HAYES, J. R., 1991. Dosage and other factors influencing toxicity, *Pesticide Toxicology, volume 1. general principles*, Academic Press, 1991, s. 39-97

ŽÁKOVÁ, Z., KOČKOVÁ, E., DVOŘÁK, P., MLEJNEK, P., 2006. Bioakumulace těžkých kovů a radionuklidů ve sladkovodních houbách a sedimentech v nádrži Mohelno, ovlivněné provozem Jaderné elektrárny Dukovany. (Bioaccumulation of heavy metals and radionuclides in freshwater sponges and sediments in the Mohelno reservoir influenced by operation of the Ducovany nuclear power plant.). In *Czech. Acta Rer. Natur.*, roč. 2, 2006, s. 85-97

## Kontaktná adresa:

MVDr. Jaroslava Nováková, PhD., Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav patologickej fyziológie, Tr. SNP č. 1, Košice, tel.: 055/6404478

E-mail: jaroslava.novakova@upjs.sk

## HYPERTERMIA A JEJ VPLYV NA POHYBLIVOSŤ KRÁLIČÍCH SPERMIIÍ HYPERTHERMIA AND ITS INFLUENCE ON RABBITS SPERMATOZOA MOTILITY

Monika Schneidgenová, Peter Chrenek, Anna Kalařová, Peter Massányi, Norbert Lukáč

### ABSTRACT

In this paper the effect of hyperthermia on the concentration, rabbits spermatozoa motility and progressive motility was analyzed. Four male rabbits in controlled hall with thermo aggregate and sensor with simulated conditions (ambient temperature  $34\pm 1^\circ\text{C}$  and  $36\pm 1^\circ\text{C}$ ) were used. Sperm was collected one per week during one month (collections 0, 8, 15, 22) using artificial vagina. CASA analyzer (Sperm Vision<sup>TM</sup>; Minitüb, Germany) for analysis of motility, progressive motility and concentration of rabbit spermatozoa was used. As control group day 0 (collection 0) of semen collection, where the temperature has not been increased yet, was determined. The lowest average concentration of spermatozoa in second collection ( $0.91\pm 0.82\cdot 10^9\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and the highest in the first collection ( $1.18\pm 0.48\cdot 10^9\cdot\text{ml}^{-1}$ ) was measured. The motility and progressive motility was the lowest in first collection ( $64.96\pm 11.79\%$  and  $50.11\pm 10.42\%$ ) when compared with control collection. Statistical evaluation showed significant differences ( $P<0.05$ ) in values of progressive motility between collections 0 and 1, collections 1 and 3 and significant differences ( $P<0.01$ ) in spermatozoa motility between collections 1 and 3.

**Key words:** spermatozoa, rabbits, hyperthermia

### ÚVOD

Environmentálne faktory a faktory vnútorného prostredia ovplyvňujú zdravie a vnútorné prostredie zvierat (Kolesarova et al., 2008; Arpášová et al., 2006; Kramárová a Chmelničná, 2004; Reiner et al., 2002; Kolesárová et al., 2002; Budáčová et al., 2001; Kramárová et al., 2001; Kováčik et al., 2000). Teplota okolitého prostredia a jej zvyšovanie je považované za jeden zo stresujúcich faktorov pôsobiacich na živé systémy (Ahmed, 2005). Králiky citlivo reagujú na extrémne environmentálne podmienky, čo zahŕňa aj teplotu okolitého prostredia (Okab et al., 2008).

Charakteristickým prejavom života spermii a ich fertilizačných vlastností je látková premena a pohyb. Metabolické procesy prebiehajúce v spermiiach sa využívajú hlavne na zabezpečenie pohybu spermii (Gamčík et al., 1992). Ejakulát sa posudzuje makroskopicky, mikroskopicky a biochemicky. Mikroskopické hodnotenie ejakulátu sa robí hneď po odbere, najneskôr do 10 minút. Vyšetrenie sa robí pri teplote  $38 - 40^\circ\text{C}$  pod mikroskopom. Posudzuje sa: koncentrácia spermii, aktivita pohybu spermii, intenzita pohybu – vírivosť a morfológické vlastnosti spermii (Massányi et al., 2002). Reprodukčný proces samcov závisí na komplexnom rade biologických vzťahov zahrňujúcich mnoho orgánov, typov buniek, typov molekúl ako aj presnú časovú a priestorovú koordináciu procesov. Nie je preto prekvapujúce, že tento zložitý biologický systém je zraniteľný rozličnými environmentálnymi faktormi, fyzikálnymi ako aj chemickými (Massányi et al., 1999).

Cieľom práce bolo sledovanie koncentrácie, pohyblivosti a progresívnej pohyblivosti spermii králikov počas pôsobenia zvýšenej teploty.

### MATERIÁL A METODIKA

Do experimentu boli zaradené mäsové línie králikov M91 materská albinotická línia, vzniknutá medzičlenným krížením (Novozélandský biely, Buskatský králik, Francúzsky stieborný) a P91 otcovská akromalistická línia, vzniknutá medzičlenným krížením (Nitriansky králik, Kalifornský králik, Veľký svetlý stieborný).

V experimente boli zaradení 4 samci, ktorí boli umiestnení v uzavretom chovnom priestore, s nainštalovaným termoagregátorom a senzorom boli simulované experimentálne podmienky s definovanou vysokou teplotou ( $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  a  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ). Simulované podmienky boli kontinuálne monitorované. Experimentálne zvieratá boli ustajnené v samostatných chovných klietkach so systémom kŕmenia a napájania *ad libitum*. Odber ejakulátu sme realizovali použitím umelej vagíny. Ejakulát sme odoberali raz týždenne počas celého obdobia realizácie pokusu (1 mesiac).

Pohyblivosť, progresívnu pohyblivosť a koncentráciu spermii sme hodnotili CASA analyzátorom (Sperm Vision<sup>TM</sup>; Minitüb – Nemecko). Ako kontrola bol určený 0. odber, počas ktorého ešte nebola simulovaná vysoká teplota.

Pre porovnanie výsledkov analýza variancie, t-test a Duncanov test boli použité pre kalkuláciu základných štatistických charakteristík a pre determináciu signifikantných rozdielov medzi skupinami použitím štatistického softvéru SAS. Štatistické rozdiely na úrovni  $P<0.05$  a  $P<0.01$  boli považované za signifikantné.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas experimentu sme sledovali koncentráciu, pohyblivosť a progresívnu pohyblivosť spermii králikov počas pôsobenia zvýšenej teploty ( $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  a  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ). Vplyv zvýšenej teploty okolitého prostredia bol pozorovaný v prípade králikov (Frosini et al., 2000), ošípaných (Kim et al., 2009), sliepok (Sahin et al., 2004) a myší (Kokura et al., 2007). V našom experimente ako kontrolnú skupinu sme stanovili 0. odber, počas ktorého ešte nepôsobila simulovaná zvýšená teplota. Zistili sme, že priemerná hodnota koncentrácie ejakulátu bola  $1,06\pm 0,65\cdot 10^9\cdot\text{ml}^{-1}$ , priemerná hodnota pohyblivosti bola  $44,38\pm 30,77\%$  a progresívnej pohyblivosti  $26,44\pm 27,80\%$ . V 1. odbere v porovnaní s kontrolným odberom boli namerané nasledovné priemerné hodnoty: koncentrácia spermii  $1,18\pm 0,48\cdot 10^9\cdot\text{ml}^{-1}$ , pohyblivosť  $64,96\pm 11,79\%$  a progresívna pohyblivosť spermii  $50,11\pm 10,42\%$ . Môžeme skonštatovať, že všetky hodnoty boli mierne zvýšené v porovnaní s 0. odberom. Boli zistené preukazné

rozdielely ( $P < 0.05$ ) pri sledovaní hodnôt progresívnej pohyblivosti medzi 0. a 1. odberom. Pri porovnaní kontrolného (0. odberu) a 2. odberu boli zistené nižšie hodnoty koncentrácie a to  $0,91 \pm 0,82 \cdot 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$ , ale pohyblivosť a progresívna pohyblivosť bola v porovnaní s kontrolným odberom mierne zvýšená, ale napriek tomu v porovnaní s 1. odberom boli všetky hodnoty mierne znížené. Pri porovnaní kontrolného a 2. odberu neboli zistené preukazné rozdiely ( $P > 0,05$ ) medzi sledovanými ukazovateľmi. Pohyblivosť spermíí v 2. odbere bola  $55,80 \pm 26,33$  % a progresívna pohyblivosť spermíí bola  $31,64 \pm 37,99$  %. Sledované priemerné hodnoty v 3. odbere boli nasledovné: priemerná hodnota koncentrácie spermíí bola  $1,12 \pm 0,67 \cdot 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$ , najnižšia priemerná hodnota pohyblivosti spermíí bola v tomto odbere a to:  $33,95 \pm 18,89$  %, taktiež bola zistená najnižšia hodnota progresívnej pohyblivosti spermíí práve v tomto poslednom odbere a to:  $19,49 \pm 15,24$  %. Preukazné rozdiely ( $P < 0,05$ ) boli zistené pri sledovaní progresívnej pohyblivosti a to medzi 0. a 3. odberom a štatistické rozdiely ( $P < 0,01$ ) boli zistené pri pohyblivosti spermíí

**Tabuľka 1** Vplyv vysokej teploty na parametre kvality spermíí králikov

	0. odber	1. odber	2. odber	3. odber
koncentrácia [ $\times 10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	$1,06 \pm 0,65$	$1,18 \pm 0,48$	$0,91 \pm 0,82$	$1,12 \pm 0,67$
pohyblivosť [%]	$44,38 \pm 30,77$	$64,96 \pm 11,79$	$55,80 \pm 26,33$	$33,95 \pm 18,89$
progresívna pohyblivosť [%]	$26,44 \pm 27,80$	$50,11 \pm 10,42$	$31,64 \pm 37,99$	$19,49 \pm 15,24$

medzi 1. a 3. odberom.

Patologické zmeny pôsobením vysokej teploty boli popísané na pohlavnej sústave samíc **Huang et al. (2009)** a **Padmanabhan et al. (2005)** a samcov (**Guo et al., 2009**) králikov. Naše výsledky korešpondujú s výsledkami autorov (**Sergerie et al., 2007**; **Shefi et al., 2007**; **Hendricks et al., 2009**) ktorí taktiež zistili zníženie kvality ejakulátu rôznych druhov zvierat a ľudí vplyvom vysokej teploty.

## ZÁVER

V našom experimente sme sledovali možný vplyv zvýšenej teploty (hypertermie) na koncentráciu, pohyblivosť a progresívnu pohyblivosť králičích spermíí. Pri hodnotení sledovaných ukazovateľov sme dospeli k týmto záverom: štatisticky preukazné rozdiely ( $P < 0,05$ ) boli zistené pri progresívnej pohyblivosti spermíí medzi 0. a 1. odberom, 1. a 3. odberom. Štatisticky preukazné rozdiely ( $P < 0,01$ ) sme zistili pri sledovaní pohyblivosti spermíí medzi 1. a 3. odberom. V porovnaní s kontrolným odberom (0. odber), boli okrem koncentrácie zistené najnižšie hodnoty v 3. odbere, v ktorom bolo pôsobenie zvýšenej teploty časovo najdlhšie. Môžeme teda skonštatovať, že zvýšená teplota (hypertermia) má určite negatívny vplyv na sledované ukazovatele kvality ejakulátu králikov.

## LITERATÚRA

AHMED, R. G. 2005. Heat stress induced histopathology and pathophysiology of the central nervous system. In *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 23, 2005, no. 6, p. 549-557.

ARPÁŠOVÁ, H., ANGELOVIČOVÁ, M., WEIS, J., KOPECKÝ, J., CAPCAROVÁ, M., HRNČÁR, C., CIVÁŇ, S. 2006. Zhodnotenie vplyvu rôznych foriem jódu na vybrané ukazovatele kvality slepačích vajec. In *Bezpečnosť*

*a kvalita surovín a potravín*. Nitra : SPU, 2006, s. 9-15. ISBN 80-8069-767-1.

BUDÁČOVÁ, A., SIROTKIN, A. V., FLORKOVIČOVÁ, I., KRAMÁROVÁ, M., KOVÁČIK, J., SANISLO, P. 2001. Vplyv pohlavného dospievania a niektorých biologicky aktívnych látok na funkciu ovariálnych buniek prasníciek. In *Journal of Farm Animal Science*, roč. 34, 2001, s. 183-190.

FROSINI, M., SESTI, C., PALMI, M., VALOTI, M., FUSI, F., MANTOVANI, P., BIANCHI, L., DELLA CORTE, L., SGARAGLI, G. 2000. Heat-stress-induced hyperthermia alters CSF osmolality and composition in conscious rabbits. In *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 279, 2000, no. 6, p. 2095-2103.

GAMČÍK, P., KOZUMPLÍK, J., MESÁROŠ, P., SCHVARC, F., VLČEK, Z., ZIBRÍN, M. 1992. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. In *Príroda*, Bratislava, s. 58- 60.

GUO, J., JIA, Y., TAO, S. X., LI, Y. C., ZHANG, X. S., HU, Z. Y., CHIANG, N., LUE, Y. H., HIKIM, A. P., SWERDLOFF, R. S., WANG, C., LIU, Y. X. 2009. Expression of nitric oxide synthase during germ cell apoptosis in testis of cynomolgus monkey after testosterone and heat

treatment. In *J. Androl.*, vol. 30, 2009, no. 2, p. 190-199.

HENDRICKS, K. E., MARTINS, L., HANSEN, P. J. 2009. Consequences for the bovine embryo of

being derived from a spermatozoon subjected to post-ejaculatory aging and heat shock: development to the blastocyst stage and sex ratio. In *J. Reprod. Dev.*, vol. 55, 2009, no. 1, p. 69-74.

HUANG, Y., HU, B., LIU, D., LIU, S. J., SHEN, E., WU, R. 2009. Measuring urethral tissue heat injury temperature of healthy male rabbits during interstitial radiofrequency ablation. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 25, 2009, no. 1, p. 56-64.

KIM, B. G., LINDEMANN, M. D., CROMWELL, G. L. 2009. The effects of dietary chromium (III) picolinate on growth performance, blood measurements, and respiratory rate in pigs kept in high and low ambient temperature. In *J. Anim. Sci.*, 2009 Jan 16. [Epub ahead of print].

KOKURA, S., ADACHI, S., MANABE, E., MIZUSHIMA, K., HATTORI, T., OKUDA, T., NAKABE, N., HANDA, O., TAKAGI, T., NAITO, Y., YOSHIDA, N., YOSHIKAWA T. 2007. Whole body hyperthermia improves obesity-induced insulin resistance in diabetic mice. In *Int. J. Hyperthermia*, vol. 23, 2007, no. 3, p. 259-265.

KOLESAROVA, A., SIROTKIN, A., KOVACIK, J. 2008. Endokrinné a vnútrobunkové mechanizmy pohlavného dospievania prasníciek. Nitra : SPU, 2009, 131 s. ISBN 978-80-552-0109-2.

KOLESÁROVÁ, A., SIROTKIN, A., KRAMÁROVÁ, M., KOVÁČIK, J., FLORKOVIČOVÁ, I., SANISLÓ, P. 2002. Úloha IGF-I a vnútrobunkových sprostredkovateľov jeho účinku v pohlavnom dospievaní prasníciek. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. Zborník z medzinárodnej vedeckej konferencie. Nitra : SPU, 2002, s. 67-69.

KOVÁČIK, J., KOLLÁROVÁ, E., SALAGOVÁ, Z., KRAMÁROVÁ, M. 2000. Úroveň močoviny, glukózy a AST v krvnom sére dojnic v rôznych fázach reprodukčného cyklu. In *Current Trends in Morphology*. Košice : UVL, 2000, s. 58-60.

KRAMÁROVÁ, M., BUDÁČOVÁ, A., KOVÁČIK, J., SALAGOVÁ, Z. 2001. Dynamika vybraných biochemických

ukazovateľov hydiny počas znáškového cyklu pri použití probiotík. In *V. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů*. Brno : MU, 2001, s. 46. ISBN 80-210-2538-7.

KRAMÁROVÁ, M., CHMELNÍČNÁ, L. 2004. Vplyv probiotika s účinnou zložkou baktérií *Enterococcus faecium* M-74 na produkčné parametre a niektoré ukazovatele tukového metabolizmu nosníc. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 7, 2004, č. 2, s. 45-49.

MASSÁNYI, P., CIGÁNKOVÁ, V., FABIŠ, M., KOVÁČIK, J., MASSÁNYIOVÁ, K., TOMAN, R. 1999. In *Reprodukčná toxikológia*. SPU, Nitra, 147 s.

MASSÁNYI, P., TRANDŽÍK, J., NAĎ, P., LUKÁČ, N., TOMAN, R., KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M. 2002. Hodnotenie výskytu patologických spermíí vo vzťahu ku koncentrácii niektorých rizikových prvkov v ejakulátoch zvierat. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. SPU, Nitra, s. 83-85

OKAB, A. B., EL-BANNA, S. G., KORIEM, A. A. 2008. Influence of environmental temperature on some physiological and biochemical parameters of New-zealand rabbits males. In *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 41, 2008, no. 1, p. 12-19.

PADMANABHAN, R., AL-MENHALI, N. M., AHMED, I., KATAYA, H. H., AYOUB, M.A. 2005. Histological, histochemical and electron microscopic changes of the placenta induced by maternal exposure to hyperthermia in the rat. In *Int J Hyperthermia*. vol. 21, 2005, no. 1, p. 29-44.

REINER, G., MELCHINGER, E., KRAMÁROVÁ, M., PFAFF, E., BÜTTNER, M., SAALMÜLLER, A., GELDERMANN, H. 2002. Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to pseudorabies virus in swine. In *Journal of General Virology*, 2002, no. 83, p. 167-172.

SAHIN, K., ONDERCI, M., SAHIN, N., GURSU, M. F., VIJAYA, J., KUCUK, O. 2004. Effects of dietary combination of chromium and biotin on egg production, serum metabolites, and egg yolk mineral and cholesterol concentrations in heat-distressed laying quails. In *Bio. Trace Elem. Res.*, vol. 101, 2004, no. 2, p. 181-192.

SERGERIE, M., MIEUSSET, R., CROUTE, F., DAUDIN, M., BUJAN, L. 2007. High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. In *Fertil. Steril.*, vol. 88, 2007, no. 4, p. 970

SHEFI, S., TARAPORE, P. E., WALSH, T. J., CROUGHAN, M., TUREK, P. J. 2007. Wet heat exposure: a potentially reversible cause of low semen quality in infertile men. In *Int. Braz. J. Urol.*, vol. 33, 2007, no. 1, p. 50-58.

### Kontaktná adresa:

Ing. Monika Schneidgenová. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KFŽ, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4896, E-mail: monika.schneidgenova@uniag.sk

## NEDOSTATKY V STRAVOVACÍCH ZVYKLOSTIACH ŠTUDENTOV STREDNÝCH ŠKÔL

## NEGATIVES IN NUTRITIONAL HABITS OF STUDENTS FROM SECONDARY SCHOOLS

*Katarína Fatrcová-Šramková, Alena Gregušová*

### ABSTRACT

The intent of the study was to gather and analyse dietary patterns of 257 schoolchildren aged 15.52-18.92 years from secondary schools in Nitra (average age  $18.22 \pm 1.33$  years). The questionnaire used to analyze the dietary patterns of subjects was amended at the Department of Human Nutrition in Nitra. Attendant's age was calculated according to World Health Organization. Height, weight, body fat, waists and hips circumferences of children were measured. Dietary patterns information were compared between girls and boys. The statistical significances of differences were tested by  $\chi^2$  test. A regular consumption of breakfast was determined in 31.5 % of girls and 49.5 % of boys ( $P < 0.01$ ). Regularly eat lunch 77.2 % of girls versus 73.7 % of boys and supper 63 % of girls and 83.1 % of boys. Fish eat almost every week just small share of attendants (3.1 % and 6.3 %). In the study is analyzed also intake of other foodstuffs (fruit, vegetables a.o.). This work was supported by project „Healthy city Nitra“.

**Keywords:** nutritional habits, food preferences, negatives, students, secondary schools, Nitra

### ÚVOD

Výživa je jedným zo základných exogénnych faktorov podmieňujúcich rast a vývoj detí, ako aj ich zdravotný stav. Vyvíjajúci sa organizmus citlivejšie reaguje na všetky zmeny vo výžive, ktoré môžu jeho vývoj determinovať v zmysle napomáhania i brzdenia (Lucht a Groothoff, 1994). V súčasnosti je nadváha najbežnejšou poruchou u detí a podľa posledných celoslovenských prieskumov u nás postihuje 13 % detí, pričom ďalších 6 % detí je obezných (Babinská et al. 2008; Kovács et al., 2008). Deti si nadváhu a obezitu častejšie prenášajú do dospelosti spolu s významne horšou kvalitou života, zvýšeným výskytom ťažkých chronických ochorení, ale aj nezanedbateľným vplyvom na duševné zdravie.

Cieľom práce bolo zanalyzovať stravovanie stredoškolských študentov v Nitre, osobitne u dievčat a chlapcov, zhodnotiť nutričné nedostatky z pohľadu zdravej výživy.

### MATERIÁL A METODIKA

Vybrané antropometrické parametre a stravovacie návyky sme zisťovali a hodnotili v súbore 257 študentov stredných škôl v Nitre vo veku 15,52-18,92 rokov (priemerný vek  $18,22 \pm 1,33$  rokov). V súbore bolo 162 dievčat a 95 chlapcov (63,04 % a 36,96 %). Vek dievčat bol  $18,26 \pm 1,26$  rokov (medián 18,18 rokov, modus 16,45 rokov a vek chlapcov bol  $18,16 \pm 1,45$  rokov (medián 18,37 rokov, modus 16,78 rokov). Vek študentov bol určený z dátumu narodenia a dátumu vyšetrenia (podľa WHO). Nutričné

návyky sme zisťovali využitím modifikovaného dotazníka pochádzajúceho zo štúdie stravovacích návykov žiakov na Slovensku (Babinská et al., 2007, 2008). Medzi dievčatami a chlapcami stredných škôl sme porovnali vybrané nutričné ukazovatele. Na základe nameranej telesnej výšky a hmotnosti sme vypočítali index telesnej hmotnosti (body mass index – BMI) podľa vzťahu:  $BMI (kg \cdot m^{-2}) = \text{hmotnosť} (kg) / \text{výška} (m)^2$ . Queteletov BMI index sme hodnotili podľa percentilových grafov. Zisťovali sme aj index centrality - pomer pás-boky (WHR; waist to hip ratio), ktorý sme vypočítali ako podiel obvodu pásu a bokov v centimetroch. Podiel telesného tuku sme merali tukomerom na princípe bioelektrickej impedančnej analýzy. Na štatistické vyhodnotenie sme použili chí-kvadrát test.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané a zistené hodnoty antropometrických parametrov skupín študentov – dievčat a chlapcov: telesnej hmotnosti ( $58,85 \pm 12,52$  a  $72,22 \pm 13,88$  kg), výšky ( $166,72 \pm 6,13$  a  $178,93 \pm 8,57$  cm), BMI ( $21,12 \pm 4,03$  a  $22,55 \pm 4,13$   $kg \cdot m^{-2}$ ), obvodu pásu ( $71,96 \pm 10,30$  a  $80,71 \pm 11,00$  cm), bokov ( $94,44 \pm 8,79$  a  $97,53 \pm 8,01$  cm) a WHR ( $0,76 \pm 0,07$  a  $0,83 \pm 0,07$ ) sú vyššie v skupine chlapcov a priemerný obsah telesného tuku ( $21,53 \pm 7,16$  a  $14,89 \pm 7,51$  %, resp.  $13,36 \pm 7,30$  a  $11,42 \pm 7,87$  %) je naopak vyšší u dievčat.

Špeciálne percentilové diagramy na hodnotenie BMI (Ševčíková et al., 2004) ukázali (tab. 1), že stredným hodnotám v rozsahu 25.-75. percentilu zodpovedalo 35,80 % zo skupiny dievčat a 42,10 % chlapcov (t.j. priaznivý výsledok pre chlapcov). Nízke až veľmi nízke hodnoty BMI malo viac dievčat (35,8 % verzus 23,16 %). Naopak vysokému až veľmi vysokému BMI prislúchalo viac chlapcov (28,39 % verzus 34,74 %). V indexe telesnej hmotnosti stredného percentilového pásma sme podobne ako v prípade telesnej výšky i samostatne pri hodnotení hmotnosti nezistili signifikantné rozdiely medzi skupinami.

V percentilových grafoch je pásmo medzi 25.-75. percentilom (v ktorom sa nachádzajú hodnoty polovice všetkých detí) „pásmom stredných hodnôt“, priemernou hodnotou je 50. percentil. Nad 75. percentilom sú deti s vyššou hodnotou, nad 90. percentilom s vysokou hodnotou a nad 97. percentilom s extrémne vysokou hodnotou. Naopak, pod 25. percentilom sú hodnoty nižšie, pod 10. percentilom veľmi nízke a pod 3. percentilom

extrémne nízke (Kovács et al., 2008). Extrémne vysoké hodnoty BMI dosiahol v našom vyšetrenom súbore takmer každý jedenásty študent, extrémne nízke mal takmer každý 29. študent.

Obezita detí môže v rôznej miere pretrvávajúť do dospelého veku v závislosti od toho, kedy sa dieťa stáva obézne. Z rôznych štúdií vyplýva, že deti obézne na začiatku svojho života (do šesť rokov) sú v dospelosti menej často obézne (26 %) než v prípade obezity detí starších ako šesť rokov. Literárne údaje uvádzajú, že obezita sedemročných detí pretrvávala asi v 51 % u dospelých vo veku 36 až 47 rokov (Tláškal, 2006).

Pri komparácii stravovacích zvyklostí sme potvrdili nasledujúce štatisticky významné rozdiely medzi dievčatami a chlapcami:

- viac dievčat (56,8 % verzus 43,2 %) konzumuje ovocie minimálne raz denne ( $P < 0,05$ ),
- viac dievčat (17,3 % verzus 6,3 %) konzumuje celozrnné fit tyčinky ( $P < 0,05$ ),
- viac dievčat (19,1 % verzus 8,4 %) preferuje bylinkové a ovocné čaje ( $P < 0,05$ );
- viac chlapcov (49,5 % verzus 31,5 %) konzumuje zväčša pravidelne raňajky ( $P < 0,01$ ),
- viac chlapcov (50,5 % verzus 32,1 %) večeria teplú večeru denne alebo takmer denne ( $P < 0,01$ ),
- viac chlapcov (54,7 % verzus 34 %) konzumuje denne mlieko ( $P < 0,01$ ),
- viac chlapcov (58,9 % verzus 38,9 %) preferuje hovädzie mäso ( $P < 0,01$ ),
- viac chlapcov (11,6 % verzus 4,3 %) konzumuje sladké pečivo ( $P < 0,05$ ),
- viac chlapcov (55,8 % verzus 35,8 %) preferuje sladené a kolové nápoje ( $P < 0,01$ ).

Ovocie konzumuje minimálne 1-krát za deň každý druhý študent. Minimálne raz za týždeň má zaradené ovocie v jedálnom lístku 30,2 % dievčat a 0,7 % menej chlapcov (tab. 2). U dievčat sme pri dennej konzumácii ovocia zaznamenali väčšiu spotrebu ako u chlapcov. Podľa Babinskej et al. (2008) a sledovania stravovacích návykov žiakov základných škôl na Slovensku (u 1000 detí, z toho 476 chlapcov a 524 dievčat vo veku 6 - 16 rokov z desiatich okresov Slovenska) ovocie prijímajú iba dve tretiny detí (65,5 %), z toho dvakrát a viackrát denne ho prijíma 35,2 % detí a raz denne konzumuje ovocie 30,3 % detí. V porovnaní s naším výskumom konzumuje ovocie raz a viackrát denne vyšší podiel žiakov základných škôl. Ďalšie porovnania stravovania detí základných škôl v Nitre

Tabuľka 1. Hodnotenie indexu telesnej hmotnosti pomocou percentilových grafov

Percentilové pásmo	Percentil	Hodnoty	Dievčatá (n = 162)		Chlapci (n = 95)	
			n	%	n	%
1	< 3.	veľmi nízke	6	3,70	3	3,16
2	3. – 9.	nízke	26	16,05	6	6,32
3	10. – 24.	nízke	26	16,05	13	13,68
4	25. – 49.	stredné	32	19,75	17	17,89
5	50.	stredné (priemerné)	0	0,00	0	0,00
6	51. – 75.	stredné	26	16,05	23	24,21
7	76. – 90.	vysoké	21	12,96	14	14,74
8	91. – 97.	vysoké	11	6,79	9	9,47
9	> 97.	veľmi vysoké	14	8,64	10	10,53



Tabuľka 2 Konzumácia ovocia

	Dievčatá (n = 162)		Chlapci (n = 95)	
	n	%	n	%
min. 1-krát/deň	92	56,8	41	43,2 <sup>+</sup>
min. 1-krát/ týždeň	49	30,2	28	29,5
menej ako 1-krát/ týždeň	21	13,0	26	27,4
<b>spolu</b>	162	100,00	95	100,00

<sup>+</sup> P < 0,05

Tabuľka 3 Konzumácia zeleniny

	Dievčatá (n = 162)		Chlapci (n = 95)	
	n	%	n	%
min. 1-krát/deň	54	33,3	21	22,1 <sup>-</sup>
min. 1-krát/ týždeň	53	32,7	31	32,6
menej ako 1-krát/ týždeň	55	34,0	43	45,3
<b>spolu</b>	162	100,00	95	100,00

<sup>-</sup> P ≥ 0,05

Tabuľka 4 Konzumácia strukovín

	Dievčatá (n = 162)		Chlapci (n = 95)	
	n	%	n	%
min. 2-krát/ týždeň	28	17,3	19	20,0 <sup>-</sup>
takmer každý týždeň	24	14,8	17	17,9
menej ako 2-krát/mesiac	110	67,9	59	62,1
<b>spolu</b>	162	100,00	95	100,00

<sup>-</sup> P ≥ 0,05

a z celého Slovenska obsahujú viaceré práce (Fatrcová-Šramková a Kolesárová, 2008a, 2008b; Fatrcová-Šramková et al., 2008).

Väčšina ovocia má nízky glykemický index a glykemickú denzitu. Má značný obsah vitamínov a minerálnych látok, ktoré sú známe ako fytonutrienty. Tieto nutrienty majú silné antikarcinogénne a antikardiovaskulárne vlastnosti (Price, 2008). Prirodzenou zložkou rastlinnej stravy je potravinová vláknina. Zdrojom vo vode rozpustnej vlákniny je ovocie a zelenina (Kováčiková et al., 2003).

U študentov, ktorí uviedli dennú konzumáciu ovocia, je priemerná frekvencia konzumácie 2,1-krát denne v dennom množstve priemerne 3,5 ks u dievčat a 2,6-krát denne v dennom množstve priemerne 4,7 ks u chlapcov. U študentov, ktorí uviedli týždennú konzumáciu, je priemerná frekvencia a množstvo konzumácie 3,2-krát 5,3 ks týždenne u dievčat a 2,2-krát 4,4 ks týždenne u chlapcov. V súbore detí z celého Slovenska bol priemerný denný príjem ovocia 2,3 ks (Babinská et al., 2008).

Nutričné odporúčania podľa potravinovej pyramídy uvádzajú denný konzum 3 až 5 porcií zeleniny, 2 až 4 porcie ovocia (USDA, 1993) preto sa odporúča konzumovať aspoň 5 porcií ovocia a zeleniny denne.

Zo sledovania konzumácie zeleniny (tab. 3) sme zistili, že zeleninu konzumuje menej ako raz za týždeň 45,3 % chlapcov a o 11,3 % menej dievčat (P ≥ 0,05). Minimálne raz za týždeň konzumuje zeleninu 32,6 % chlapcov a o 0,1 % viac dievčat. Priaznivejšie výsledky vzhľadom na nutričné odporúčania sme pri konzumácii zeleniny zaznamenali u dievčat. Babinská et al. (2008) uvádza, že

25,9 % detí zeleninu konzumuje každý deň (t.j. menej detí ako v našom súbore z Nitry) a takmer štvrtina vyšetrených detí (24,3 %) ju jedáva menej ako raz do týždňa.

Priemerné množstvo a frekvencia konzumácie zeleniny je pri uvedení denného konzumu 1,6-krát denne v množstve 3,5 ks u dievčat a 1,7-krát denne 3,3 ks u chlapcov. Pri uvedení týždenného konzumu je to 2,5-krát týždenne 4,0 ks u dievčat a 2,9-krát týždenne 6,6 ks u chlapcov. V súbore žiakov z celého Slovenska Babinská et al. (2008) uvádza priemerný konzum zeleniny 1,2 ks denne. Béderová (2004) uvádza z výživového režimu detí a dospievajúcej mládeže (zo základných a stredných škôl) negatívne hodnotenie deficitnej spotreby zeleniny. Denne ju konzumovalo len 10 % opýtaných.

Zo sledovania konzumácie strukovín sme zistili, že strukoviny konzumuje menej ako dvakrát za mesiac 67,9 % dievčat a o 5,8 % menej chlapcov (tab. 4) (P ≥ 0,05). Nepriaznivé výsledky vzhľadom na prevenciu diabetu a iných metabolických chorôb, resp. s ohľadom na nutričné odporúčania sme tak pri konzume strukovín zistili najmä u chlapcov. Väčšina strukovín má glykemický index a glykemickú denzitu nízku, pretože má vysoký obsah vlákniny a proteínov. Ale komerčne pripravené strukoviny obsahujú veľa soli (Price, 2008).

Ryby konzumuje každý týždeň veľmi málo žiakov – 3,1 % dievčat a 6,3 % chlapcov (P ≥ 0,05). Menej ako raz mesačne sa ryby nachádzajú v stravovaní 67,3 % dievčat a o 8,4 % menej chlapcov.

V ďalšej časti výskumu sme analyzovali zaraďovanie rôznych potravín do medzijedál počas dňa. Neraňajkuje alebo vypije len čaj 38,3 % dievčat a 26,3 % chlapcov (t.j. o 12 % viac dievčat). Zväčša nepravidelne raňajkuje 30,2 % dievčat a 24,2 % chlapcov. Nepriaznivé výsledky sme tak pri konzumácii raňajok s ohľadom na nutričné odporúčania zistili u dievčat.

Na desiatu jedáva pravidelne sladkosť alebo jedlo z bufetu takmer každý tretí študent (42 % dievčat a 37,9 % chlapcov) a desiatu nejedáva 6,2 % dievčat a 11,6 % chlapcov. Pravidelne ovocie, zeleninu alebo mliečny výrobok na desiatu konzumuje podľa Babinskej et al. (2008) iba 45,1 % respondentov; 1,8 % detí nekonzumuje desiatu vôbec (čo je prekvapujúci a priaznivý výsledok) a nezanedbateľné percento detí (10,2 %) pravidelne jedáva na desiatu pokrm z bufetu alebo sladkosti. Zároveň sa pritom so stúpajúcim vekom znižuje počet detí, ktoré desiatajú ovocie, zeleninu alebo mliečne výrobky a naopak, zvyšuje sa percento detí, ktoré pravidelne jedávajú pokrmy z bufetu alebo sladkosti (z 2,9 % v skupine 6- až 8-ročných až na 25,2 % vo veku 15 až 16 rokov).

Obed v našom súbore konzumuje nepravidelne 22,8 % dievčat a 26,3 % chlapcov. Namiesto obeda jedáva pravidelne jedlo z bufetu (hot-dog, hamburger, bagetu a pod.) 10,5 % dievčat a 7,4 % chlapcov.

Olovrant nejedáva asi tretina študentov (35,2 % dievčat a 33,7 % chlapcov). V súvislosti s konzumáciou olovrantu

**Babinská et al. (2008)** uvádza, že 91,7 % detí v sledovanom súbore olovrantuje (t.j. viac ako v našom výskume), z toho 40,3 % pravidelne jedáva ovocie, zeleninu alebo mliečny výrobok na olovrant. Pritom vekom signifikantne klesá percento detí, ktoré pravidelne konzumujú tieto nutrične hodnotné potraviny a naopak zvyšuje sa počet detí, ktoré zvyknú olovrantovať sladkosťami alebo pokrm z bufetu (z 2,7 % v skupine 6- až 8-ročných na 20 % v kategórii 15- až 16-ročných).

Z vyšetrených stredoškolských študentov v Nitre nepravidelne večeria 32,1 % dievčat a 13,7 % chlapcov a nevečeria 4,9 % dievčat a 3,2 % chlapcov. Pravidelne na druhú večeru nejedáva ovocie, zeleninu alebo mliečny výrobok 19,1 % dievčat a 17,9 % chlapcov ( $P \geq 0,05$ ). Druhú večeru nejedáva každý druhý študent (45,1 % dievčat a 41,1 % chlapcov). V pravidelnom konzume chleba, syra, sladkostí alebo orieškov na druhú večeru sa podiel žiakov medzi skupinami výrazne nelíšil (35,8 % dievčat a 41,1 % chlapcov). V súbore **Babinskej et al. (2008)** takmer polovica detí konzumuje i druhú večeru, z toho dve tretiny pravidelne jedávajú na druhú večeru ovocie, zeleninu alebo mliečny výrobok, tretina syr, chlieb, sladkosťami alebo oriešky; pričom ovocie, zeleninu alebo mliečny výrobok pravidelne jedávajú na druhú večeru najmä mladšie deti.

U viac ako polovice nášho súboru (50,6 % dievčat a 52,6 % chlapcov) sa doma spoločne stoluje len cez víkend, cez týždeň sa stravuje každý sám. Aspoň raz denne rodina stoluje u približne štvrtiny skupín žiakov bez významného rozdielu medzi dievčatami a chlapcami.

Občas jedáva pochúťky („maškrty“) pri sledovaní televízie 74,7 % dievčat a 67,4 % chlapcov. Pravidelne ich konzumuje každý ôsmy študent (o 9,3 % viac chlapcov ako dievčat). Priaznivejšie výsledky vzhľadom na prevenciu metabolických chorôb, resp. s ohľadom na nutričné odporúčania sme tak pri pravidelnom konzume pochúťok zistili u dievčat. Nikdy ich nekonzumuje 16,7 % dievčat a len o 2 % menej chlapcov ( $P \geq 0,05$ ).

Vo vyšetovanom súbore trpí inými (ako potravinovými) alergiami 25,3 % dievčat a 9,5 % chlapcov. Anémia, anorexia a iné choroby sa vyskytujú u 7,4 % dievčat a alergia na bielkovinu kravského mlieka u 3,1 % dievčat. Skutočnosť, že u chlapcov sa nevyskytuje ani jedna z týchto chorôb, poukazuje na nižšie riziko porúch zdravia v dôsledku nedostatočnej či nesprávnej skladby výživy.

V štúdiu HELENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescents) – v rámci trojročného projektu financovaného EÚ, ktorý mal za cieľ prehĺbiť poznatky o životnom štýle a stravovacích návykoch mladých ľudí od 13 do 16 rokov v 10 krajinách Európy, boli zistené nasledujúce poznatky: Tri jedlá za deň a medzitým malé občerstvenia boli typické pre každú krajinu okrem Španielska, kde mladí adolescenti konzumujú 3-5 jedál a medzitým aj malé občerstvenia. Malé občerstvenie bolo charakteristické pre všetky krajiny najmä v čase po skončení vyučovania. Zdá sa, že záujem o zdravé spôsoby stravovania alebo životný štýl je pomerne malý. Mladí ľudia poznajú niektoré teórie o výžive a zdraví, ale oveľa väčšie problémy majú s aplikáciou poznatkov do praxe, majú však aj nesprávne názory alebo im poznatky o potravinách chýbajú (**Gilbert et al., 2007**).

Naše zistené nedostatky v stravovacích zvyklostiach možno eliminovať nasledovne:

- od raného veku človeka zabezpečiť osvojovanie správnych stravovacích návykov, správnej frekvencie príjmu dennej stravy s dôrazom na konzumáciu raňajok,
- jesť pravidelne, pomaly a viackrát denne menšie porcie, s ohľadom na správny pomer makronutrientov, obsah mikronutrientov a vlákniny, ktorých dostatočný príjem má preventívny vplyv na kardiovaskulárne a ďalšie civilizačné choroby,
- sledovať energetickú hodnotu potravín, nekonzumovať potraviny s vysokým glykemickým indexom, ktoré zvyšujú riziko vzniku obezity a iných metabolických porúch,
- ponúkať deťom školského veku dostatok zeleniny a ovocia v čerstvom stave, zvlášť v zimných mesiacoch,
- akcentovať osvetu správnej výživy na školách (u rodičov, u detí), zabezpečiť automaty obsahujúce mlieko a mliečne výrobky, bufety ponúkajúce vo väčšom množstve ovocie a zeleninu, resp. potraviny so zvýšeným obsahom vlákniny a funkčné potraviny,
- dodržiavať zdravý životný štýl vrátane dostatočnej pohybovej aktivity z dôvodu vyváženej energetickej bilancie.

### ZÁVER

Z výsledkov štúdie u detí považujeme za najzávažnejšie zistenie nedostatočný príjem nutrične hodnotných potravín ako napríklad zeleniny, ovocia (najmä u chlapcov), mlieka (najmä u dievčat), ďalej vynechávanie raňajok (najmä u dievčat), preferenciu sladených nápojov (najmä u chlapcov). Výsledky odrážajú viaceré nedostatky v stravovacích návykoch detí, ktoré môžu nežiaduco ovplyvniť príjem nutrične významných živín a nepriaznivo sa prejaviť na zdravotno-nutričnom stave detí školského veku a zvýšiť riziko zdravotných porúch.

Nedostatok nutrične cenných potravín (mlieka a mliečnych výrobkov, ovocia a zeleniny, kvalitných druhov mäsa a mäsových výrobkov, rýb a i.) u detí zvyšuje riziko chronických neinfekčných chorôb, ale negatívne sa odráža aj v hodnotení vybraných rastových parametrov, ktoré sú považované za nepriamy ukazovateľ kvality života celej populácie. Dostatočné zastúpenie ovocia a zeleniny ako potravín s nízkou energetickou hodnotou a vysokým obsahom živín je významné i z hľadiska prevencie obezity. Základným odporúčaním pre prax zostáva podpora správnych nutričných návykov formovaných od útleho detského veku ako jedna z najúčinnějších foriem prevencie nutrične podmienených chorôb. Dôležitá úloha v rámci nutričného vzdelávania patrí predovšetkým rodine, ale i škole.

### LITERATÚRA

BABINSKÁ, K., KOVÁCS, L. et al. 2008. Obezita, výživa a pohybová aktivita u detí. 1. vyd. Bratislava: LF UK, 2008. 43 s. ISBN 978-80-223-2552-3

BABINSKÁ, K., VITÁRIUŠOVÁ, E., HĽAVATÁ, A., ROSINSKÝ, J., BABINSKÁ, K. ML., KOŠŤÁLOVÁ, L., PRIBILINCOVÁ, Z., KOVÁCS, L. 2008. Stravovacie návyky žiakov základných škôl na Slovensku. In *Nové trendy vo výžive detí*. Bratislava: Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, 2008. s. 17-28. ISBN 978-80-223-2430-4.

- BABINSKÁ, K., VITÁRIUŠOVÁ, E., ROSINSKÝ, J., BABINSKÁ, K. ml., KOŠTÁLOVÁ, E., HLAVATÁ, A., PRIBILINCOVÁ, Z., KOVÁCS, L. 2007. Stravovací režim školákov na Slovensku. In *Pediatrica pre prax*, roč. 8, 2007, č. 4, s. 217 – 220.
- DECALUWE, V., BRAET, C. 2005. The cognitive behavioural model for eating disorders: a direct evaluation in children and adolescents with obesity. In *Eating Behaviors*, vol. 6, 2005, no. 3, p. 211 – 220.
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., KOLESÁROVÁ, A., NŮŽKOVÁ, J., BABINSKÁ, K. 2008. Nutrition habits and anthropometric parameters of Slovak children. In *Slovak Journal of Animal Science*, vol. 41, 2008, no. 4, p. 198.
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., KOLESÁROVÁ, A. 2008a. Hydinové mäso a ryby vo výžive detí školského veku. In *2. medzinárodné vedecké hydinárske dni*: Zborník z medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra, Slovakia, 16.-17. september 2008. Nitra : SPU, 2008. s. 228-234. ISBN 978-80-552-0102-3
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K., KOLESÁROVÁ, A. 2008b. Komparácia stravovacích zvyklostí detí školského veku v Nitre versus v rámci SR. In *Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe*, Nitra, 5.12.2008. Nitra : SPU, 2008. s. 318-326. ISBN 978-80-552-0151-1
- GILBERT, C. C., SANCHEZ, M. J., LEHOUX, C. et al. 2007. Qualitative research investigating food choices and preferences of adolescents in Europe. Abstract and poster on behalf of the HELENA study group [www.helenastudy.com](http://www.helenastudy.com). In *Potraviny dnes (Food Today)*, 2007, 7. Dostupné na internete: [www.eufic.org/article/sk/5/21/artid/food-choices-preferences-adolescents-Europe](http://www.eufic.org/article/sk/5/21/artid/food-choices-preferences-adolescents-Europe)
- KOVÁCS, L., BABINSKÁ, K., ŠEVČÍKOVÁ, E. et al. 2008. Nové trendy vo výžive detí. Bratislava : Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, 2008. 92 s. ISBN 978-80-223-2430-4
- LUCHT, F., GROOTHOFF, W. J. 1994. Social inequalities and health among children aged 10-11 in the Netherlands: causes and consequences. Groningen : Dept. Of Health Sciences, University of Groningen, 1994. 21 pp.
- TLÁSKAL, P. 2006. Obezita dítäte (tuková tkáň, rizikové faktory, prevence). In: *Vox pediatrica*, roč. 6, 2006, č. 3, s 26-29.
- PRICE, R. 2008. Glycemic Matrix Guide to Low GI and GL Eating. West Conshohocken : Infinity pub, 2008. 132 pp. ISBN 0-7414-4691-X
- SPEAR, B. A., BARLOW, S. E., ERVIN, CH. et al. 2007. Recommendations for treatment of child and adolescent overweight and obesity. In *Pediatrics*, vol. 120, 2007, Suppl. 4, p. S254 – 288.
- ŠEVČÍKOVÁ, E., NOVÁKOVÁ, J., HAMADE, J. et al. 2004. Percentilové grafy a antropometrické ukazovatele: Telesný vývoj detí a mládeže v SR. Úrad verejného zdravotníctva, 2004. s. 6-13.
- USDA (United States Departure of Agriculture). 1993. USDA's Food guide – Background and Development. Miscellaneous Publication, Number 1514, 1993.
- WESTENHOEFER, J. 2002. Establishing dietary habits during childhood for long-term weight control. In *Annals of Nutrition and Metabolism*, vol. 46, 2002, Suppl. 1, p. 18 – 23.
- WESTENHOEFER, J., STUNKARD, A. J., PUDEL, V. 1999. Validation of the flexible and rigid control dimensions of dietary restraint. In *International Journal of Eating Disorders*, vol. 26, 1999, no. 1, p. 53 – 64.

### Pod'akovanie:

Práca bola riešená v rámci projektu „Nitra-Zdravé mesto“.

### Kontaktná adresa:

Ing. Katarína Fatrcová-Šramková, PhD., Katedra výživy ľudí FAPZ SPU Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: [katarina.sramkova@gmail.com](mailto:katarina.sramkova@gmail.com)

## INDUKCIA MIKROJADIER V KOSTNEJ DRENI PREPELÍC PO PÔSOBNÍ KADMIA A ZINKU

### INDUCTION OF MICRONUCLEI IN QAIL'S BONE MARROW AFTER EXPOSITION OF CADMIUM AND ZINC

*Irena Šutiaková, Beáta Korenéková, Magdaléna Skalická, Pavol Nad', Natalia Kovalkovičová*

#### ABSTRAKT

In this study, we evaluated the frequency of micronuclei in bone marrow erythrocytes of Japanese quails treated with cadmium ( $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) and zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) salts. The quails in group 1 were not given any supplements, acting as controls. The animals in group 2 received 0.12 mg Cd / d in drinking water. The quails in group 3 were supplied with a combination of 0.12 mg Cd / d and 4 mg Zn / d. The mean value of the total number of micronuclei observed in polychromatic erythrocytes of quails in group 2 was significantly higher than that found in the control group 1 ( $P=0.001$ , Anova test and Tukey test  $P < 0.05$ ). No significant difference was found between control group 1 and experimental group 3. We have not observed cytotoxic effect in both experimental groups.

**Keywords:** Quail, genotoxicity, cytotoxicity, micronuclei, cadmium, zinc

#### ÚVOD

Každý rok narastá počet chemických látok, ktoré kontinuálne vstupujú do životného prostredia a môžu sa bioakumulovať v tkánivách živých organizmov. Prevalencia toxických nie esenciálnych prvkov

v potravinovom reťazci je významným faktorom ich pôsobenia na zdravie ľudí a živočíchov (Cybulski et al., 2009).

Kovy a ich zlúčeniny môžu mať v určitých koncentráciách toxické resp. genotoxické účinky na živý organizmus (Hartwig, 1994, 1995, 1998). Kadmium je

environmentálny polutant, ktorý je špeciálne spojený s antropogénnou aktivitou. Uvedený prvok je klasifikovaný ako karcinogén pre ľudí. Karcinogénny mechanizmus kadmia nie je úplne prebadaný (Waalkes, 2000). Primárny účinok kadmia sa predpokladá, že spočíva v tvorbe reaktívnych kyslíkových zlúčenín. Tvorba reaktívnych kyslíkových látok navodená kadmium môže poškodiť genetický materiál v organizme. Môže indukovať chromozomálne aberácie a iné cytogenetické zmeny ako aj DNA zlomy u rôznych cicavčích druhov (Filipič a Hei, 2004). Zinok je kofaktorom v mnohých enzýmoch a regulačných proteínoch, kde patria aj enzýmy DNA biosyntézy a ich opravy, transkripčné faktory regulujúce expresiu génov, ktoré tiež kontrolujú bunkovú proliferáciu (Strydom et al., 2006). Na druhej strane priemyselné polutanty môžu produkovať vysoké koncentrácie zinku a tak môžu byť tiež toxické pre živé organizmy (Koréneková et al., 2006). Mikrojadrový erytrocytárny test sa často využíva pri štúdiu *in vivo* genotoxicity rôznych xenobiotík, pričom najčastejšie sa jedná o kostnú dreň hlodavcov (Krishna a Hayashi, 2000). Bhunya, Jena (1992, 1993) vyvinuli a študovali vplyv xenobiotík v *in vivo* teste kostnej drene hydiny. Cieľom práce bolo študovať cytogenetický vplyv kadmia a kombináciu kadmia a zinku na frekvenciu mikrojadier v kostnej dreni prepelíc po dobu 35 dní.

## MATERIÁL A METÓDY

Uvedené experimentálne štúdie sme vykonali podľa etických požiadaviek schválené Etickou komisiou pre zvieratá pri UVL v Košiciach.

Experimentálne zvieratá

Do pokusu sme zaradili japonské prepelice (*Coturnix coturnix japonica*) vo veku 30 dní. Zvieratá boli o priemernej hmotnosti 170 g.

Prepelice sme krmili štandardnou výživou pre hydinu HYD – 10 *ad libitum*. Zloženie potravy sme uviedli v tabuľke 1 podľa vyhlášky č. 149 / 2, 100 / 2003 MP SR (Anonymus, 2003). Priemerná denná dávka výživy bola 40 g potravy / deň prepelice.

Zvieratá boli umiestnené v klietkach vhodných pre takýto druh zvierat, kŕmené a napájané *ad libitum* a aklimatizované týždeň pred expozíciou. Klimatické podmienky boli udržiavané v ustajňovacích priestoroch po celú dobu trvania experimentu. Teplotu sme udržiavali pri 22 °C ± 2 °C a relatívnu vlhkosť od 30 – 70 %, ako aj svetelný režim (12 hodín svetlo, 12 hodín tma). Zdravotný stav prepelíc ako aj príjem potravy a vody sme denne kontrolovali.

Testované chemikálie a iné použité chemikálie v

experimente:

Síran zinočnatý – Zn SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O p.a. a chlorid kademnatý CdCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O p.a. (fy MERCK, Germany), sme rozpúšťali v destilovanej vode. Ďalej sme použili bovinné fetálne sérum (fy PAN, Systems, GmbH, Biotechnologische Produkte, Germany). Na farbenie preparátov sme použili May – Grünwaldovo a Giemsa – Romanovského farbivo. Na fixáciu preparátov sme použili metanol.

Dávka a expozícia

Prepelice sme rozdelili do dvoch skupín po 6 zvierat a v jednej skupine boli 4 prepelice. Síran zinočnatý a chlorid kademnatý sme rozpustili v destilovanej vode a aplikovali každý deň nasledujúcim spôsobom a to v nasledovne uvedených dávkach. Kontrolná skupina zvierat(1) mala príjem vody a potravy bez akýchkoľvek prídavkov. Jedna pokusná skupina prepelíc (2) dostavala 0,12 mg Cd / deň, ktorý bol rozpustený vo vode. Druhá pokusná skupina prepelíc(3) prijímala kombináciu 4 mg Zn / deň a 0,12 mg Cd / deň vo forme roztokov v destilovanej vode.

Spracovanie biologického materiálu.

Po ukončení poslednej expozície xenobiotíkmi (35 dní) sme prepelice usmrtili a z oboch končatín izolovali femury. Kostnú dreň sme získali po odstránení epifýz, a to vyplavením fetálnym bovinným sérom v objeme 2 – 3 ml do centrifugačných skúmaviek. Kostnú dreň sme centrifugovali pri 1500 – 2000 RPM.min<sup>-1</sup> počas 20 minút. Po odstránení supernatantu sme zo sedimentu pripravili preparáty na podložných sklách. Preparáty sme fixovali metanolom. Bunky kostnej drene sme zafarbili farbivom May – Grünwaldom a Giemsa – Romanovski počas 3- 4 minút.

Vyhodnotenie preparátov

Pri hodnotení a identifikácii mikrojadier v kostnej dreni prepelíc sme sa pridržovali prác Bhunya , Jena (1992, 1993) a Krishna ,Theiss (1995).

Polychromatické erytrocyty (PCE) s jedným, alebo viacerými mikrojadrami sme počítali v 2000 erytrocytoch na zviera. Prepočítali sme frekvenciu mikrojadier na 1000 buniek. Hodnotili sme aj frekvenciu mikrojadier pri normochromatických erytrocytoch (NCE). Vypočítali sme cytotoxický účinok látky z polychromatických buniek a normochromatických buniek ako doplňujúci parameter. Preparáty sme hodnotili na mikroskope Nikon – Labophot – 2 A, pri 4 x 10 a 10 x 100 násobnom zväčšení. Pri uvedenom mikroskope sme použili pri hodnotení program Animal a Photostyler (Aldus Corporation, USA).

Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky sme spracovali štatisticky programom Sigma Stat Jandel – Scientific<sup>R</sup>, (Version 2.0) za použitia Anova testu a Tukeyho testu.

Tabuľka 1: Zloženie prípravku použitého v pokuse pre prepelice

Zloženie	Jednotky g / kg	Minerálne prvky	Jednotky mg / kg	Vitamíny	Jednotky
Surový proteín	153	Zinok	60	A	8,000 IU.kg <sup>-1</sup>
Energia	11,5 MJ.kg <sup>-1</sup>	Kalcium	45	D 3	1,60 IU.kg <sup>-1</sup>
popol	160	Fosfor	5,0	E	10 mg .kg <sup>-1</sup>
Vláknina	60	Sodík	2,5	BB 122	4,0 mg .kg <sup>-1</sup>
Lyzín	7,0	Mangán	40	-	10 mg .kg <sup>-1</sup>
Metionín+ Cysteín	6, 0	Železo	40	-	-
Metionín	3,5	Meď	4,0	-	-
Kyselina linoleová	15	-	-	-	-

## VÝSLEDKY

V tabuľke 2 sme uviedli výsledky uvedeného pokusu pri aplikovaní mikrojadrového testu *in vivo* po dobu 35 dní u japonských prepelíc po podaní samotného chloridu kademnatého a v kombinácii so síranom zinočnatým v pitnej vode.

## potravinárstvo

Chlorid kademnatý v dávke 0,12 mg / deň v pitnej vode spôsobil signifikantné zvýšenie frekvencie mikrojadier pri polychromatických erythrocytoch prepelíc v porovnaní s kontrolnou skupinou zvierat 2, 167 ± 0, 516/1000 buniek oproti kontrole 0,750 ± 0,524/1000 buniek, (P = < 0,001, Anova test, Tukey test, P < 0,05).

Frekvencia mikrojadier pri normochromatických erythrocytoch v pokusnej skupine (2) po aplikovaní chloridu kademnatého nebola štatisticky zvýšená oproti kontrolnej skupine zvierat (P = 0,85). Pri kombinovanej aplikácii chloridu kademnatého a síranu zinočnatého skupine (3) nezaznamenali sme signifikantné zvýšenie frekvencie mikrojadier pri polychromatických erythrocytoch prepelíc 1,125 ± 0,479/1000 buniek oproti kontrolnej skupine prepelíc 0,750 ± 0,524/1000 buniek, (P = 0,286). Pri tejto kombinácii xenobiotík neboli v uvedenej skupine štatisticky významné rozdiely vo frekvencií mikrojadier pri normochromatických bunkách. V oboch experimentálnych skupinách sme nepozorovali cytotoxický účinok kadmia samotného ako aj v kombinácii so zinkom (P=0,165; P=0,218).

Vysvetlivky: PCE-polychromatické erythrocyty; NCE-normochromatické erythrocyty; MN- mikrojadrá; MN distribúcia v PCE/2000- distribúcia mikrojadier s rôznym počtom v polychromatických erythrocytoch; K1-K6, kontrolná skupina(1); Cd10/1-Cd10/6, experimentálna

skupina po expozícií kadmim(2); Cd+Zn/1- Cd+Zn/4, experimentálna skupina po expozícií kadmia a zinku(3); \*, štatistická významnosť pri Anova teste (P=<0,001); †, štatistická významnosť pri Tukeyho teste (P<0,05); ns-štatisticky nevýznamné výsledky.

### DISKUSIA

Štúdium genotoxicity rôznych xenobiotík má význam zo všeobecného aspektu, a to pre identifikáciu DNA poškodenia. Tieto poškodenia môžu byť manifestované vo forme génových mutácií, štrukturálnych chromozómových aberácií, rekombinácií a numerických zmien. Tieto zmeny môžu byť zodpovedné za dedičné anomálie v pohlavných bunkách a preto sú nebezpečné pre ďalšie generácie. Taktiež bolo doposiaľ zaznamenané, že rôzne xenobiotiká môžu spôsobiť mutácie DNA v rôznych typoch buniek, ktoré sa dávajú do súvislosti s karcinogenitou (Jena et al., 2002; Yamada et al., 2009). Bolo pozorované, že kovové ióny s karcinogénnym efektom nie sú mutagénne väčšinou pre baktérie, ale naopak sú karcinogénne pre rôzne typy cicavčích buniek. Predpokladá sa, že existujú dva spôsoby ich účinku v tomto smere. V prípade zlúčenín kadmia, olova, arzénu sa predpokladá, že ide o narušenie tzv. reparačných procesov pri nízkych, nie – cytoxických koncentráciách týchto zlúčenín. Dokonca rôzne kroky v DNA reparačných procesoch môžu byť ovplyvnené

**Tabuľka 2** Frekvencia a distribúcia mikrojadier v kostnej dreni prepelíc po expozícií kadmim a v kombinácií kadmia a zinku

Zviera/ Pohlavie/ Samica	MN distribúcia v PCE/2000				MN PCE/1000	MN distribúcia v NCE/2000				MN NCE/1000	PCE/NCE
	1	2	3	4		1	2	3	4		
K1	1	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0,0	0,847
K2	1	1	0	0	1,5	1	0	0	0	0,5	0,760
K3	2	0	0	0	1,0	1	0	0	0	0,5	0,615
K4	0	1	0	0	1,0	2	0	0	0	1,0	1,021
K5	0	0	0	0	0,0	1	2	0	0	2,5	0,931
K6	1	0	0	0	0,5	1	0	0	0	0,5	0,574
X					0,750					0,833	0,791
SD					0,524					0,876	0,176
SEM					0,214					0,357	0,072
Cd 10/1	1	1	1	0	3,0	1	0	0	0	0,5	0,878
Cd 10/2	1	2	0	0	2,5	1	1	0	0	1,5	0,646
Cd 10/3	3	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0,0	0,906
Cd 10/4	2	1	0	0	2,0	3	0	0	0	1,5	0,340
Cd 10/5	4	0	0	0	2,0	2	0	0	0	1,0	0,548
Cd 10/6	2	1	0	0	2,0	2	0	0	0	1,0	0,232
X					2,167 <sup>*†</sup>					0,917	0,592
SD					0,516					0,585	0,275
SEM					0,211					0,239	0,112
P					=<0,001, <0,05					=0,85 <sup>ns</sup>	=0,165 <sup>ns</sup>
Cd + Zn/1	1	1	0	0	1,5	1	0	0	0	0,5	0,937
Cd + Zn/2	1	1	0	0	1,5	1	0	0	0	0,5	0,869
Cd + Zn/3	2	0	0	0	1,0	2	0	0	0	1,0	1,348
Cd + Zn/4	1	0	0	0	0,5	1	0	0	0	0,5	0,792
X					1,125					0,625	0,986
SD					0,479					0,250	0,248
SEM					0,239					0,125	0,124
P					=0,286 <sup>ns</sup>					=0,661 <sup>ns</sup>	=0,218 <sup>ns</sup>

rôznymi kovmi, takže pri jednom spoločnom mechanizme môže ísť o kompetitívnu súťaživosť s esenciálnymi kovovými iónmi (Hartwig, 1995). Genotoxický potenciál kadmia bol zistený jednak v *in vitro* analýzách ale aj *in vivo* štúdiách (Hurná, Hurná 2000; Blasiak, 2001; Ohba et al., 2007). My sme zaznamenali v našich experimentoch zvýšenú frekvenciu mikrojadier pri polychromatických erythrocytoch po pôsobení kadmia samotného, čo poukazuje na jeho genotoxický účinok v kostnej dreni prepelíc. Tieto experimentálne štúdie potvrdili podobné práce v tomto smere, že zlúčeniny kadmia majú genotoxický efekt *in vivo*. Čelík et al. (2009) sledovali genotoxický vplyv chloridu kademnatého na frekvenciu mikrojadier v kostnej dreni a periférnej krvi u potkanov po akútnom a toxickom pôsobení. Ich experimenty poukázali, tak ako v našom prípade, že chlorid kademnatý signifikantne zvyšoval frekvenciu mikrojadier pri polychromatických erythrocytoch kostnej drene, ako aj v erythrocytoch periférnej krvi ( $P < 0,001$ , resp.  $P < 0,01$ ). Ďalej ich výsledky poukázali na cytotoxický potenciál kadmia v prípade kostnej drene, ale nie v prípade buniek periférnej krvi. My sme nezaznamenali cytotoxický účinok kadmia v kostnej dreni prepelíc, čo môže byť zdôvodnené aj kratším časom pôsobenia, rozdielnou dávkou pôsobenia ako aj druhom zvieratá. Podobné výsledky zaznamenali aj Jagetia, Adiga (1994). Títo autori študovali cytogenetický vplyv chloridu kademnatého v koncentráciách 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 a 2 mg Cd / kg ž.h. na frekvenciu mikrojadier pri PCE v kostnej dreni myši. Zistili, že kadmium ovplyvňuje frekvenciu mikrojadier pri PCE v závislosti na dávke.

Zinok je esenciálny prvok, ktorý má dôležité postavenie v niektorých bunkových procesoch, včítane DNA syntézy, transkripcie a translácie. Zinok môže mať aj protektívny účinok oproti iným kovom, ale aj toxický efekt (Hartwig, 1998).

Deficiencia zinku môže viesť ku zvyšovaniu DNA oxidácie, DNA zlomov a chromozómovému poškodeniu. Naopak zinok vo zvýšenej koncentrácii môže viesť ku toxicite (Piao et al., 2003). Mechanizmus tolerancie toxického efektu kadmia po aplikovaní zinku je stále intenzívne študovaný. Totižto z biologického aspektu zinok hrá pravdepodobne dôležitú úlohu v toxicite a karcinogenite v súvislosti s expozíciou kadmia. To môže vyplývať z ich podobnej chemickej povahy a ich interakčného vzťahu s biologickými systémami. (Hartwig, 1995). V našich experimentoch sme nezaznamenali pri kombinovanom podaní kadmia a zinku zvýšenú frekvenciu mikrojadier pri polychromatických erythrocytoch v kostnej dreni prepelíc. V uvedených dávkach zlúčeniny zinku prejavili ochranný efekt voči genotoxickému účinku kadmia v pokusoch *in vivo* u prepelíc. Smaliskiené et al. (2006) sledovali po dobu 6 týždňov v orgánoch, resp. bunkách a tkanivách myši účinok kadmia a kadmia so zinkom na ich distribúciu v jednotlivých orgánoch a krvi ako aj na mitotickú aktivitu pečenej buniek. Ich výsledky naznačili, že koncentrácia kadmia v organizme môže byť modulovaná vplyvom zinku, ale je to diferencované v jednotlivých orgánoch. Napríklad intraperitoneálne podanie kadmia signifikantne zvýšilo mitotickú aktivitu pečenej buniek a podanie zinku veľmi mierne ovplyvnilo mitotickú aktivitu buniek.

Zinok podaný vo zvýšenej koncentrácii môže mať toxický efekt na hematopoetický systém. Cytogenetický toxický efekt zinku bol pozorovaný v kostnej dreni potkanov, ktorý sa prejavil vo zvýšenej frekvencii mikrojadier, ak bol podaný zinok v dávke 8 mg / kg ž.h. Ich výsledky naznačili, že vo zvýšenej koncentrácii podanie zinku môže viesť aj ku toxicite (Piao et al., 2003). My sme neštudovali v našich pokusoch vplyv zinku na frekvenciu mikrojadier v kostnej dreni prepelíc.

Na základe týchto čiastkových výsledkov vyplýva, že ochrana zdravia populácie je potrebná aj cez potravinový reťazec.

### ZÁVER

Výsledky poukázali na genotoxický vplyv samotného kadmia na základe frekvencie mikrojadier pri polychromatických erythrocytoch v kostnej dreni japonských prepelíc. Kadmium v kombinácii so zinkom nemal pri použitých dávkach genotoxický efekt na frekvenciu mikrojadier v kostnej dreni prepelíc pri polychromatických erythrocytoch. Nepozorovali sme cytotoxický účinok chloridu kademnatého samotného ako aj v kombinácii so síranom zinočnatým na erythrocyty kostnej drene prepelíc. Na základe týchto čiastkových výsledkov vyplýva, že ochrana zdravia populácie je potrebná aj cez potravinový reťazec.

### LITERATÚRA

- ANONYMUS, 2003. Dekrét Ministerstva Pôdohospodárstva Slovenskej republiky č. 149, 2, 100, 2003.
- BLASIAK, J, 2001. DNA - damaging effect of cadmium and protective action of quercetin. In *Pol. J. Environ. Studies*, roč. 10, 2001, č.6, s. 437-442.
- BHUNYA, S. P., JENA, G. B. 1992. Genotoxic potential of an the organochlorine insecticide lindane ( $\gamma$ -BHC), an *in vivo* study in chicks. In *Mutat. Res.* roč. 272, 1992, s. 175 – 181.
- BHUNYA, S. P., JENA, G. B. 1993. Studies on the genotoxicity of monocrotophos, an organophosphate insecticide, in the chick *in vivo* test system. In *Mutat. Res.* roč. 292 1993, s.231 -239.
- ČELÍK, A., BÜYÜKAKILLI, B., CIMEN, B., TAŞDELEN, B., ÖZTÜRK, M. I., EKE, D, 2009. Assessment of Cadmium genotoxicity in peripheral blood and bone marrow tissues of male wistar rats. In *Toxicol. Mech. Methods*, roč. 19, 2009, č.2, s.135 – 140.
- CYBULSKI, W., CHALABIS-MAZUREK, A., JAKUBCZAK, A., JAROSZ, L., KOSTRO, K., KURSA, K., 2009. Content of lead, cadmium, and mercury in the liver and kidneys of silver foxes (*Vulpes Vulpes*) in relation to age and reproduction disorders. In *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. Roč.53, 2009, s.65-69.
- FILIPÍČ, M., HEI, T., K, 2004. Mutagenity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. In *Mutat. Res.*, roč. 546, 2004, s. 81 – 91.
- HARTWIG, A., 1994. Role of DNA-repair inhibition in lead-induced and cadmium induced genotoxicity. A review. In *Environ. Health Perspect.*, roč. 102, 1994, s. 45 -50,
- HARTWIG, A.: Current aspects in metal genotoxicity (Mini – review) In *Bio Metals*. 8, 3- 11s, 1995.
- HARTWIG, A., 1998. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. In *Toxicol. Lett.* roč. 102 -103, 1998, s. 235 -239.

- HURNÁ, E., HURNÁ, S., 2000. Protective effect of zinc on cadmium – induced micronuclei in V 79 cells. In *J. Trace Elem. Med. Biol.*, roč. 14, 2000, č.1, s. 55-57.
- JAGETIA, G. CH., ADIGA, S. K., 1994. Cadmium chloride induces dose – dependent increases in the frequency of micronuclei in mouse bone marrow. In *Mutat. Res.* roč. 306, 1994, s.85- 90.
- JENA, G. B., KAUL, C. L., RAMARO, P., 2002. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: Impact of ich guidelines. In *Ind. J. Pharmacol.*, roč. 34, 2002, 86 – 99.
- KRISHNA, G., THEISS, J. C., 1995. Concurrent analysis of cytogenetic damage *in vivo*. A multiple endpoint – multiple tissue approach. In *Environ. Mol. Mutagen.* roč. 25, 1995, s.314 -320.
- KRISHNA, G., HAYASHI, M., 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. In *Mutat Res.*, roč. 455, 2000, s. 81-95.
- KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M., NAĎ, P., 2006. Zinc in cattle from area polluted by long – term emissions . In *Bull Environ Contam Toxicol.*, roč. 76, 2006, s. 84 – 688.
- OHBA, K., OKAWA, Y., MATSUMOTO, Y., NAKAMURA, Y., OHTA, H., 2007. A study of investigation of cadmium genotoxicity in rat bone cells using DNA microarray. In *J. Toxicol. Sci.*, roč. 32, 2007, č. 1, s. 107-109.
- PIAO, F., YOKOYAMA, K., MA, N., YAMAUCHI, T., 2003. Subacute effects of zinc various tissues and organs of rates: In *Toxicol. Lett.*, roč. 145, 2003, s. 28 – 35.
- SMALINSKIENĖ, A., LESAUSKAITĖ, V., RYSELIS, S., ABDRAKHMANOV, O., KREGŽDYTE, R., IVANOV, L., KONDRATAS, D., 2006. Effects of six-week intoxication on cadmium and zinc distribution in internal organs and blood and on the mitotic activity of liver cells. In *Biologia*, roč. 4, 2006, s.76-79.
- STRYDOM, C., ROBINSON, C., PRETORIUS, E., WHITCUTT, J. M., MARX, J., BORNMAN, M. S., 2006. The effect of selected metals on the central metabolic pathways in biology: A review. In *Water SA*, roč. 32, 2006, č.4, s.543-554.
- YAMADA, H., UENISHI, R., SUZUKI, K., KOIZUMI, S., 2009. Cadmium – induced alternations of gene expression in human cells. In *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, roč. 28, 2009, s. 61 -69.
- WAALKES, M. P., 2000. Cadmium carcinogenesis in review. In *J. Inorg. Biochem.*, roč. 79, 2000, s. 241 -244.

### Pod'akovanie:

Práca bola podporovaná grantom VEGA MŠ SR ,  
č.1/1336/04 a č. 1/ 04303/08.

### Kontaktná adresa:

doc. RNDr. Irena Šutiaková, PhD., Fakulta humanitných  
a prírodných vied PU, Ul. 17. Novembra 1, 081 61 Prešov,  
e-mail: sutiakova@gmail.com

## IODINE CONTENT IN COW MILK IN THE CZECH REPUBLIC

*Jan Trávníček, Ivan Herzig, Vlasta Kroupová, Helena Pešinová, Roman Konečný*

### ABSTRACT

The aim of the work is to assess the current iodine content in cow milk in the Czech Republic. In 2008, 85 bulk milk samples were analysed using the colorimetric method. The average iodine content in milk was  $435.6 \pm 328.7 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$ . Low values (less than  $80 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$ ) were shown by 5% of the samples; values of  $80$  to  $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  were in 30% of the samples; 31% of the samples contained  $250$  up to  $500 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$ . In 34% the iodine content exceeded  $500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . The given values testify to a continuing tendency for iodine in cow milk to increase. An increase in the concentration of iodine in milk above  $200$ - $500 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  constitutes an undesirable load for lactating cows and consumers of cow milk caused by an excessive iodine intake.  $200 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  of milk can be considered as optimum iodine content in cow milk in terms of the health and needs of lactating cows and inhabitants of the Czech Republic.

**Keywords:** milk, iodine, surplus, mineral mixtures

### INTRODUCTION

The iodine content in cow milk is fundamentally influenced by its intake. The relation of the iodine content in a feed ration and in milk can be expressed by a correlation coefficient of 0.66 (Maas et al., 1989). However, many works from recent years draw attention to an uncontrolled increase of iodine in cow milk (Jahreis et al., 1999, Bader et al., 2005, Trávníček et al., 2006) in connection with the use of mineral feed additives and other mineral supplements with a high iodine content as a fodder (Jahreis et al., 2001). In connection with the serving of mineral feed additives with an iodine content of  $20$ - $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of dry matter, Kroupová et al. (2001) recorded an increase in iodine in cow milk to values higher than  $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  with a maximum being  $596.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Trávníček et al. (2001) ascertained  $594.8 \pm 178.1 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  in the milk of dairy cows when supplementing iodine to the level of 250% of daily need. In the years 2004-2005, Trávníček et al. (2006) ascertained  $442.5 \pm 185.6 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  on average in milk in south-west Bohemia before it underwent dairy

processing. In Slovakia in 2002-2007, 6.5% of milk samples showed more than  $500 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$ . In Great Britain an increase in iodine from  $150$  to  $311 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  (MAFF, 2000) was detected between the years 1992 and 1999.

In view of the risk of an excessive iodine intake through milk and milk products, Commission Regulation (EC) No. 1459/2005 resulted in a reduction of the maximum permissible iodine content in a complete feed ration for dairy cows from  $10 \text{ mg}$  of  $\text{I}\cdot\text{kg}^{-1}$  to  $5 \text{ mg}$  of  $\text{I}\cdot\text{kg}^{-1}$  of the feed ration with a dry matter of 88%. However, current standards on the need of nutrients (Sommer et al., 1993) applied in the CR recommend for dairy cows the iodine content in a feed ration at the level of  $0.8 \text{ mg}$  per  $1 \text{ kg}$  of the dry matter of the feed ration (feed).

The aim of the work submitted is to assess the current state of iodine content in raw cow milk produced chiefly in large-capacity facilities in the Czech Republic.



**Table 1** Average iodine content in milk of dairy cows from breeding facilities in the CR in 2003-2008 ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )

Year	n	x	sx	min	max	median
2003-4	226	310.41	347.4	2.1	2512.2	213.6
2005	84	380.0	306.1	4.3	1471.4	308.4
2006	102	371.8	235.0	51.3	928.7	314.9
2008	85	435.62	328.7	28.2	1668.0	343.4

**Table 2** Iodine content in bulk milk samples in 2003-2008 ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )

Iodine in milk ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	2003-4 % of breeding facilities	2005 % of breeding facilities	2006 % of breeding facilities	2008 % of breeding facilities
< 80	19	6	6	5
80-250	38	33	32	30
250-500	27	45	35	31
>500	16	16	27	34

## MATERIAL AND METHODS

In the course of 2008, an examination was made of a total of 85 bulk milk samples from dairy cow breeding facilities coming from 28 districts of 9 regions of the Czech Republic. Of this number, 60 samples were taken in cooperation with regional workplaces of the Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture in Prague; the samples were obtained in breeding facilities with significant milk production within the region. The results of analyses were compared with the values of iodine in bulk milk samples ascertained in the years 2003-4, 2005, and 2006. In 2003-2004 an examination was made of the iodine content in bulk milk samples from 226 farms of 66 districts, which represents approximately 78% of the territory of the CR and 28,000 dairy cows bred; in 2005 in milk from 84 farms of 16 districts of 4 regions, and in 2006 from 102 farms of 33 districts of ten regions of the CR. Iodine in milk was determined at the workplace of the Faculty of Agriculture of the University of South Bohemia in České Budějovice and of the Veterinary Research Institute in Brno colorimetrically using the Sandell-Kolthoff method (Bednář, 1964).

## RESULTS AND DISCUSSION

The average iodine content in milk in 2008 obtained on the basis of the analysis of 85 bulk milk samples reached the value of  $435.6 \pm 328.7 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  (Table 1). The broad range of values from 28.2 to  $1,668.0 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  points out to

great differences in the supply of individual dairy cow breeding facilities with iodine but also to the continuing need of area iodine supplementation in dairy cow breeding facilities (Kursa et al., 2005). The values ascertained also confirm (Figure 1) a trend to a rise in the iodine content in raw milk already recorded in 2003-2006 (Kursa et al., 1997; Kursa et al., 2005; Trávníček et al., 2006).

In 2008, low values (less than  $80 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), which are associated with an insufficient iodine intake (Herzig and Suchý, 1996; Kroupová et al., 2001), were approximately in 5% of samples taken (Table 2). Values ranging from 80 to  $250 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$ , corresponding both to optimum saturation and requirements for the iodine content in milk as a foodstuff were shown by 30% of the samples. Values ranging from 250 to  $500 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  were ascertained in 31% of the samples,

and concentrations over  $500 \mu\text{g}$  of iodine  $\cdot\text{l}^{-1}$  in 34% of samples analysed (Table 2). Concentrations exceeding  $1,000 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  were ascertained in 5 cases (6%). The representation of bulk milk samples with an iodine content corresponding to its nutritional excess (more than  $250 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  in milk) was 63% in 2008, 62% in 2006, 63% in 2005, and 43% in 2004. Milk samples from breeding facilities that significantly participate in milk production within their region showed higher iodine content on average:  $519.0 \pm 346.2 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$  and higher percentage representation of concentrations above  $500 \mu\text{g I}\cdot\text{l}^{-1}$ . By contrast, the iodine concentration in breeding facilities in the regime of an ecologic or possibly extensive system of farming (2.3% of breeding facilities) from the area of southwest Bohemia was at the level of  $30 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  of milk.

The average iodine content in milk of the entire set of breeding facilities in the CR included for monitoring in 2008 did not significantly differ from the average values in the years from 2005 to 2006. It has been confirmed again (Kursa et al., 2005; Trávníček et al., 2006) that there is no threat of iodine insufficiency globally in dairy cows in the CR and drinking milk represents a luxury source of iodine in human nutrition.

Table 3 provides several examples of the daily intake of iodine by dairy cows from the recommended amount of mineral supplements. The given mineral supplements (premixes) are utilized especially in large-capacity breeding facilities to cover the whole spectrum of

**Table 3** Iodine content in selected premixes and mineral supplements for dairy cows

Premix Mineral supplement	I content ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	I dose in g per head and day	Share in feed mixture (%)	Intake of iodine in mg per head and day
VITAMIX - S	80-110	100-300		8.0-33.0
CAMISAN	400	200		80.0
CALPROSAN	190	300		57.0
RINDAMIN LE 2006 plus	350	100-200		35.0-70.0
MKP A - E	50-100	150-300	3.0-4.0	17.5-35.0
PREMIN M 1 - 5	100	150-300	3.0-4.0	15.0-30.0
MP-S/ZBCHS premix	600		0.8-3.0	31.2-117

indispensable microelements. The actual iodine intake at higher rations of mineral supplements satisfactory in terms of the need of other micronutrients mostly exceeds the optimum iodine dose (0.8 mg in 1 kg of dry matter of feed) for lactating cows (Sommer et al., 2004). Higher iodine concentrations in MKP for cattle in the milligram quantity of a daily dose does not significantly exceed the price of mineral supplements and does not mostly exceed the upper limit of content of 5 mg of I in 1 kg of 80% dry matter of the feed ration, defined by Commission Regulation (EC) No. 1459/2005.

Excessive iodine supplementation in a feed ration was ignored to a certain extent after 2000 in view of previous experience of its shortage accompanied by a decrease in the iodine content in milk below the limit of 100 µg I<sup>-1</sup> (Kroupová et al., 2001). Until 2003 the rise in the concentration of iodine in milk was assessed as a significant factor in the interdisciplinary solution to iodine deficiency in inhabitants of the Czech Republic. The steady increase in iodine in milk even after the resolution to area iodine deficiency in inhabitants of the Czech Republic in 2000 (Kříž, 2003) can be considered as a clear reason for reducing the iodine concentration in some mineral feed additives and premixes. The limitation of excessive iodine supplementation in lactating cows in the CR is also substantiated considering an increase in the iodine concentration in the urine of inhabitants, which is an objective indicator of their iodine saturation (Kříž, 2003, Anke, 2007).

## CONCLUSION

The iodine content in the milk of lactating cows in the CR documents the indispensability of its supplementation in terms of the health of cows and inhabitants. A bearable iodine intake in cows was achieved between the years 1999-2003 with the average iodine concentration in milk ranging from 129 to 310 µg I<sup>-1</sup>. At this concentration of iodine in milk in combination with a higher intake of iodine in iodized salt and other foodstuffs, iodine deficiency of inhabitants of the Czech Republic was eliminated. An increase in the iodine concentration in raw cow milk in the period of 2003-2008 above 200 up to 500 µg I<sup>-1</sup> mainly in large-capacity breeding facilities with the highest efficiency constitutes an undesirable load for lactating cows and consumers of cow milk caused by an excessive iodine intake. The solution consists in the reduction of iodine concentration in some mineral supplements to a level corresponding to the physiological need of lactating cows. 200 µg I<sup>-1</sup> of milk can be considered as optimum iodine content in cow milk in terms of the health and need both of lactating cows and inhabitants of the Czech Republic.

## REFERENCES

ANKE, M.: Iod. In: DUNKELBERG, H., GEBEL, T., HARTWIG, A., 2007. Handbuch der Lebensmitteltoxikologie Belastungen, Wirkungen, Lebensmittelsicherheit, Hygiene. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007, s. 2317-2379. ISBN 978-3527-31166-8.

BEDNÁŘ, J., RÖHLING, S., VOHNOUT, S. 1964. Příspěvek ke stanovení proteinového jódu v krevním séru. In *Českoslov. Farm.*, 1964,13, s. 203-209.

BADER, N., MÖLLER, U., LEITERER, M., FRANKE, K., JAHREIS, G., 2005. Iodine content in human milk and cow's milk increased continuously - In *Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances in Animal Feed on the request from the Commission on the use of iodine in feedingstuffs. The EFSA Journal*, 2005, 1-42.

HERZIG, I., SUCHÝ, P., 1996. Současný pohled na význam jódu pro zvířata. In *Vet. Med.- Czech*, 1996, 41, s. 379-386.

HERZIG, I., TRÁVNÍČEK, J., KURSA, J., KROUPOVÁ, V. 2005. The content of iodine in pork. In *Vet. Med.- Czech*, 2005, 50, s.521-525.

JAHREIS, G., LEITERER, M., FRANKE, K., MAICHROWITZ, W., SCHÖNE, F., HESSE, V. 1999. Jodversorgung bei Schulkindern und zum Jodgehalt der Milch. In *Kinderärztliche Praxis*, 1999, 16, s. 172-181.

JAHREIS, G., HAUSSMANN, W., KIESSLING, G., FRANKE, K., LEITERER, M. V. 2001. Bioavailability of iodine from normal diets rich in dairy products - results of balance studies in women. In *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 2001, 109, s. 163-167.

KROUPOVÁ, V., HERZIG, I., KURSA, J., TRÁVNÍČEK, J., THÉR, R. 2001. Saturace krav jódem v České republice. In *Veterinářství*, 2001, s. 155-158.

KŘÍŽ, J., 2003. Jódový deficit; české a zahraniční poznatky a zkušenosti. In *Praktický lékař*, 2003, 83, s. 575-579.

KURSA, J., HERZIG, I., KROUPOVÁ, V., KRATOCHVÍL, P. - TRÁVNÍČEK, J. 1997. Consequences of iodine deficiency cattle in some regions of Czech Republic. In *Scientia Agric. Bohem.* 1997, 28, s. 105-117.

KURSA, J., HERZIG, I., TRÁVNÍČEK, J., KROUPOVÁ, V. 2005. Milk as a Food Source of Iodine for Human Consumption in the Czech Republic. In *Acta Veterinaria Brno*, 2005, 74, s. 255-264.

MAAS, J., BERG, J. N., PETERSEN, R. G. 1989. Serum distribution of iodine after oral administration of ethylenediamine dihydroiodide in Cattle. In *American Journal of Veterinary Research*, 1989, 50, s. 1758-1759.

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food): Iodine in Milk. Food Surveillance Information Sheet 198, London. 2000.

SOMMER, A., ČEREŠŇÁKOVÁ, Z., FRYDRYCH, Z., KRÁLÍK, O., KRÁLÍKOVÁ, Z., KRÁSA, A., PAJTÁŠ, M., PETRIKOVIČ, P., POZDÍŠEK, J., ŠIMEK, M., TRÍNÁCTÝ, J., VENCL, B., ZEMAN, L., 1994. *Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro přežvýkavce.* ČÁZV, VÚVZ Pohořelice, 1994, 96 s.

TRÁVNÍČEK, J., HERZIG, I., KURSA, J., KROUPOVÁ, V., NAVRÁTILOVÁ, M., 2006. Iodine content in raw milk. In *Veterinární Medicína*, 2006, 51, s. 448-453.

## Acknowledgment:

The work was implemented with the financial support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic – National Agency for Agricultural Research Grant No. QH81105: Patophysiological Effects Owing to Alimentary Iodine Excess in Cattle and Sheep.

## Contact address:

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture, Czech Republic, tel. 387772619, fax. 387772619, travnic@zf.jcu.cz

## NEW PERSPECTIVES IN FOOD SAFETY: EXPOSURE OF THE POPULATION TO ESTROGENIC CHEMICALS

Barbara Pinto, Daniela Reali

### ABSTRACT

Endocrine disrupting chemicals are substances present in diet as technological additives or environmental contaminants able to modify the endocrine homeostasis in humans, particularly the estrogenic/androgenic response.

We used a yeast-based *in vitro* assay (YES) to assess the estrogenic/antiestrogenic activity of organic extracts of seafood, aquaculture water, mineral and drinking water, bee pollen, and tomato. In addition, plastics used in water and food packaging were tested. Twenty-seven percent of seafood samples, 27.3% of aquaculture water and 7.9% of mineral and drinking water showed estrogen-like activity. The highest values of estrogenicity were elicited by aquaculture water and silicone pipes (59% and 86.7% of estradiol, respectively). Bee pollen and tomato samples highly inhibited the estradiol-induced enzymatic activity.

Our results show a widespread distribution of estrogen-like compounds in food and food-packaging materials. The increased frequency of reproductive malformations and infertility in males as well as of breast cancer and endometriosis in women has been associated by several authors to exposure to EDCs through the food chain. Therefore, we suggest the need to assess the overall exposure of the population through the food chain by using first-level screening tests. This basic knowledge would allow to design monitoring strategies for the prevention of human exposure to be applied in Public Health.

**Keywords:** food safety; YES test; estrogenic/antiestrogenic activity

### INTRODUCTION

Food within a balance diet may have positive and even protective effects on human health. However, there is increasing evidence that a great deal of anthropogenic compounds are present in food and may induce more harm than benefits.

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are a heterogeneous group of substances present in food as technological additives or as environmental contaminants which can cause, even at low doses, deleterious effects on hormonal homeostasis in humans especially in the medium and long term and although these compounds can only be slightly harmful in adulthood, there is evidence that they affect the intrauterine and neonatal life as well as adolescent development (Colborn, 2004; Rogan and Ragan, 2007; Weisglas-Kuperus et al., 2004). Potential targets of EDCs are all tissues and organs containing specific receptors for steroid and thyroid hormones. Recently, much attention has been focused on substances with estrogenic and androgenic activities.

Diet is probably the main source of exposure to EDCs for general population. However, the growing availability of scientific data has clearly demonstrated the ubiquitous presence in the environment of such substances resulting in a potential multiple exposure of the populations and shows a variety of mechanisms with multiple targets and effects.

Many different EDCs are present in food and include both xenobiotics such as Persistent Organic Pollutants (POPs), particularly dioxins, Polychloro Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs), (Antunes and Gil, 2004; Bonefeld-Jørgensen et al., 2000) pesticides (Bayarri et al., 2001; Catalan et al., 2004), manufacturing products and in packaging (phthalates, bisphenol A) (Balafas et al., 1999; Bošnjir et al., 2007), personal care products such as cosmetics and UV filters (parabens, nonylphenols, champhors) (Schmitt et al., 2008), and bioactive compounds of natural origin (flavonoids, lycopene, micotoxins, etc.) (Hirsch et al., 2007; Ososki and Kennelly, 2003) which could act in synergy or antagonism with the hormone-like polluting agents.

The aim of this study was to know the real presence and extent of estrogenic compounds in different food and environmental matrices as basic knowledge for designing monitoring strategies of prevention of human exposure to be applied in Public Health.

First, we evaluated the estrogenic/antiestrogenic activities of extracts of food products (seafood, mineral and drinking water, bee pollen consumed as a dietary supplement, and tomato, one of the main component of the Mediterranean diet) by using a short term yeast-based *in vitro* assay. In addition, environmental water collected at aquaculture plants and plastic equipments commonly used in food packaging were tested to understand the role of technological contaminants with regard to toxicological risk.

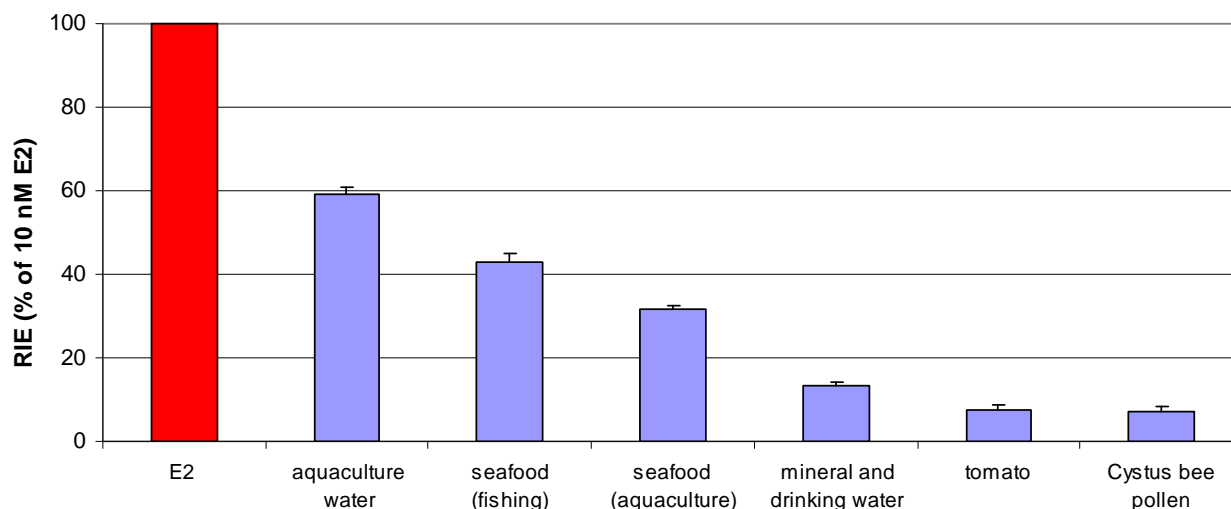
### MATERIALS AND METHODS

#### Samples

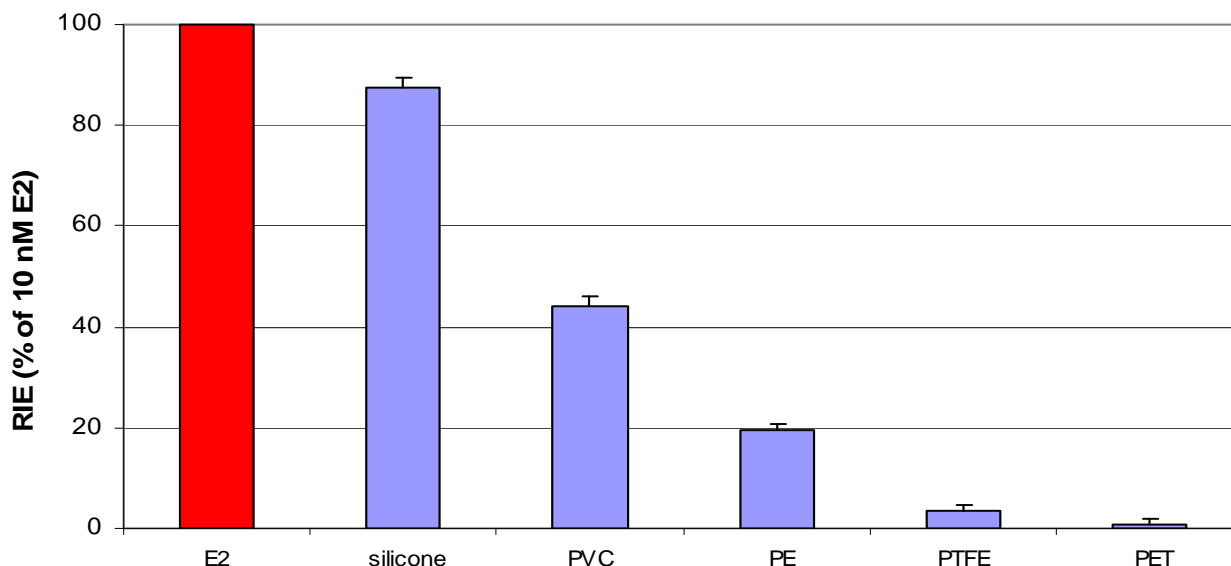
We analysed for estrogenic/antiestrogenic activities the following samples: organic extracts of seafood, bottled mineral water and drinking water, bee pollen *Cystus incanus* consumed as a dietary supplement, hydrophilic and lipophilic extracts of a commercial cultivar of tomato (cv. Money-maker), water collected at aquaculture farms, sterile mQ water filtered through plastic tubes in silicone, polyvinylchloride (PVC), polytetrafluorethylene (PTFE) polyethylene terephthalate (PET), and polyethylene (PE) at a flow rate <15 ml/min. Overall, 201 samples were analyzed. The extraction procedures have been previously described (Pinto et al., 2005 and 2008; Pinto and Reali, 2009).

#### *In vitro* test

A recombinant *S. cerevisiae* yeast strain (Liu and Picard, 1999) expressing the human estrogen receptor  $\alpha$  (hER $\alpha$ ) and an estrogen-responsive element (ERE) bound to the reporter gene lacZ encoding for the enzyme  $\beta$ -galactosidase was used. The assay measures  $\beta$ -galactosidase induction following the activation of the receptor and the expression of the reporter gene lacZ. The production of the enzyme  $\beta$ -galactosidase is measured



**Fig. 1** Estrogenic activity of food and aquaculture water. For each sample the highest value detected is shown. Values are expressed as percent activity (Relative Inductive Efficiency, RIE) of the activity induced by 10 nM E2 used as a positive control  $\pm$  SD.  $p < 0.05$  compared with the control value.



**Fig. 2.** Estrogenic activity of plastic materials used in water technological equipment and food packaging. For each sample the highest value detected is shown. Values are expressed as percent activity (Relative Inductive Efficiency, RIE) of the activity induced by 10 nM E2 used as a positive control  $\pm$  SD.  $p < 0.05$  compared with the control value.

with a spectrophotometer (OD<sub>420</sub> nm). The method has been previously described (Pinto et al., 2004 and 2006). The extracts were added to the yeast culture so that the solvent concentration did not exceed 1% (v/v). 17 $\beta$ -estradiol (E2) was used as a positive control, vehicle as a negative control. Estrogenic activity was expressed as Relative Inductive Efficiency (RIE) calculated as the ratio between the maximal  $\beta$ -galactosidase activity obtained with each extract and that elicited by 10 nM 17  $\beta$ -estradiol (E2)  $\times$  100.

To test for antiestrogenic activity, samples were cotreated with 1 nM E2. Samples that were able to inhibit the activity of the natural ligand E2 led to a dose-dependent decrease in  $\beta$ -gal expression, that was associated with a concurrent decrease in the rate of change in the colour of the medium. The ability of the test compounds to inhibit

the estradiol-dependent transcriptional activity was expressed as inhibition (%) of the enzymatic activity elicited by E2 (Ahn et al., 2004).

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statgraphic 2.1 Plus software. A  $p$  value less than 0.05 was used as the level of significance. The data are presented as mean and standard error of at least three independent experiments. We considered positive a compound if the variability due to the treatment (doses) was statistically significant greater than the variability due to the inter-experiment variability (experiments), and the effect was assessed by multifactor analysis of variance (MANOVA). A further criterion relies on the assessment of the presence of a significant dose-response relationship within a range of doses, at least two

effective ones, and it was assessed by the multiple range test (MRT) and linear regression analysis (LRA).

## RESULTS AND DISCUSSION

Twenty-seven percent of seafood samples, 27.3% of aquaculture water and 7.9% of drinking water showed estrogenic activity. In Figure 1 and 2 are showed the highest values of estrogenic activity measured in different samples. Bee pollen and tomato samples showed a generally low estrogenic activity (maximal  $\beta$ -gal < 10% of E2). Aquaculture water showed to contain mixtures of chemicals able to induce high estrogenic activity (59% of E2) in the yeast assay. The quality of stabling water significantly ( $p=0.03$ ) influenced the quality of seafood. Among the plastic materials, extracts of water flowed through silicone pipes showed the highest estrogenic activity (86.7% of E2).

Results from antiestrogenic activity are showed in Table 1. Bee pollen and tomato extracts showed the highest antagonistic activity (62.6% and 61.2 % inhibition of E2, respectively) by inhibiting in a dose dependent manner the estradiol-induced enzymatic activity. Mineral and drinking water generally did not show high antiestrogenic activity (maximal value detected, 22.5% inhibition of E2). Silicone, PVC and PTFE showed 34.5%, 12.2% and 48.3% inhibition of E2 activity, respectively.

**Table 1.** Antagonistic activity of food and food packaging materials on  $\beta$ -Gal activity induced by E2 in yeast. For each sample the highest average value of inhibitory activity detected is shown. Values are expressed as inhibition (%) of the enzymatic activity elicited by 1 nM E2 used as a positive control. The yeast strain was incubated with 1 nM E2 in the presence or absence of each individual sample.

Sample	Inhibition (%)
<i>Food</i>	
Mineral and drinking water	22.5
Tomato	61.2
Bee pollen	62.6
<i>Technological equipment</i>	
Silicone	34.5
PVC	12.2
PTFE	48.3

The results of this study show a widespread distribution in food and food packaging materials of compounds able to deregulate the estrogenic system. Particularly interesting is the evidence that food products commonly used in the human diet in our Country such as tomatoes, are able to interfere with the hormonal pathways eliciting a marked antiestrogenic activity *in vitro*.

This study shows how important is to use high sensitive bioassays in a preliminary screening to detect compounds that can act on hormone receptors. We think their use should be implemented.

EDCs are of specific relevance among food-related risk factors because of the many aspects that need to be explored yet, such as possible long-term effects,

particularly on vulnerable groups of population, the evaluation of synergistic effects of hormonally active compounds each present at low doses. the chances of risk management through the prevention and the control of the food production chain.

Efforts should be made to integrate scientific knowledge in this field, by identifying compounds of priority interest to be included in control plans, as well as environmental matrices and food which could be more vulnerable, and to upgrade and integrate the methods for surveillance. In particular, approaches should be outlined that allow to integrate different data sources, to allow a realistic assessment of the overall exposure to specific groups of contaminants and to ensure a high level of food safety. Such a control of the food production chain can implement the chances for risk management in Public Health.

This type of approach may provide an important resource for the preliminary assessment of the risk to humans to introduce toxic compounds or mixtures of chemicals through food consumption which can disrupt the endocrine system, particularly the estrogen pathway.

As the humans are at the top of the food chain and many EDCs tend to bioaccumulation, the challenges posed by endocrine disruption cannot be solved in the short term.

To date, scientists have sufficient knowledge to implement the use of *in vitro* assays as a preliminary screening and to apply the precautionary principle in order to avoid exposure to deregulating compounds.

## REFERENCES

- AHN, E. M, NAKAMURA, N., AKAO, T., NISHIHARA, T, HATTORI, M. 2004. Estrogenic and antiestrogenic activities of the roots of *Moghania philippinensis* and their constituents. *Biol. Pharm. Bull.*, 27:548-553.
- ANTUNES, P., GIL, O. 2004. PCB and DDT contamination in cultivated and wild Sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. *Chemosphere*, 54:1503-1507.
- BALAFAS, D., SHAW. K. J, WHITFIELD, F. B. 1999. Phthalate and adipate esters in Australian packaging materials. *Food Chem.*, 65:279-287.
- BAYARRI, S., BALDASSARRI, L.T., IACOVELLA, N., FERRARA, F., DI DOMENICO, A. 2001. PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere*, 43:601-610.
- BONEFELD-JØRGENSEN, E. C., ANDERSEN, H. R., RASMUSSEN, T. H., & VINGGAARD, A. M. 2000. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology*, 158:141-153.
- BOŠNIR, J, PUNTARIĆ, D, GALIĆ, A, ŠKES, I, DIJANIC, T, KLARIĆ, M, GRGIĆ, M, ČURKOVIĆ, M, ŠMIT Z. 2007 . Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water. *Food Technol. Biotechnol.*, 45:91-95.
- CATALAN, J., VENTURA, M., VIVES, I., GRIMALT, J. O. 2004. The roles of food and water in the bioaccumulation of organochlorine compounds in high mountain lake fish. *Environmental Science and Technology*, 38:4269-4275.
- COLBORN, T. 2004. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environ. Health Perspect.*, 112(9):944-949.
- HIRSCH, K., ATZMON, A., DANILENKO, M, LEVY, J., SHARONI. Y. 2007. Lycopene and other carotenoids inhibit

estrogenic activity of 17beta-estradiol and genistein in cancer cells. *Cancer Res. Treat.*, 104(2):221-230.

LIU, J. W., JEANNIN, E., PICARD, D. 1999. The anti-estrogen hydroxytamoxifen is a potent antagonist in a novel yeast system. *Biol. Chem.*, 380(11):1341-1345.

OSOSKI, A. L., KENNELLY, E. J. 2003 Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother. Res.*, 17:845-869

PINTO, B., PICARD, D., REALI, D. 2004. A recombinant yeast strain as a short term bioassay to assess estrogen-like activity of xenobiotics. *Ann. Ig.*, 16:579-585.

PINTO, B., GARRITANO, S., REALI, D. 2005. Occurrence of estrogen-like substances in the marine environment of the Northern Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, 50(12):1681-1685.

PINTO, B., GARRITANO, S. L., CRISTOFANI, R., ORTAGGI, C., GIULIANO, A., AMODIO-COCCHIERI, R., CIRILLO, T., DE GIUSTI, M., BOCCIA, A., REALI, D. 2008. Monitoring of polychlorinated biphenyl contamination and estrogenic activity in water, commercial feed and farmed seafood. *Environ. Monit. Assess.*, 144:445-453.

PINTO, B., REALI, D. 2009. Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 212:228-232.

ROGAN, W. J., RAGAN, N. B. 2007. Some evidence of effects of environmental chemicals on the endocrine system in children. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 210(5):659-667.

SCHMITT, C., OETKEN, M., DITTBERNER, O., WAGNER, M., OEHLMANN, J. 2008. Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Pollut.*, 152(2):322-329.

WEISGLAS-KUPERUS, N., VREUGDENHIL, H. J., MULDER, P. G. 2004. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicol. Lett.*, 149(1-3):281-285.

### Contact address:

Dr. Barbara Pinto, SpD., Dep. of Experimental Pathology, M.B.I.E., Laboratory of Environmental Toxicology and Hygiene, University of Pisa, Via San Zeno, 37, 56127 Pisa, Italy, Tel. +39 050 2213586, Fax. +39 050 2213588 E-mail b.pinto@med.unipi.it

## VPLYV MANAŽMENTU DOJENIA NA ZDRAVIE VEMENA BAHNÍC, KVALITU A KVANTITU MLIEKA

## THE EFFECT OF MILKING MANAGEMENT ON THE UDDER HEALTH, MILK QUALITY AND QUANTITY IN DAIRY EWES

*Lucia Mačuhová, Dana Tančinová, Juliana Mačuhová, Vladimír Tančín*

### ABSTRACT

The objective of machine milking is to drain the udder of ewes as completely as is possible without causing any trauma to animal or a worsening udder health status and teat condition. During machine milking, there is a high risk of mastitis appearance. This risk must be considered by milking management. Milking process can be influenced by many factors e.g.: frequency of milking, pulsation rate, vacuum pressure, labour input. Well organized milking process requires optimal adjusted parameter of milking machine, correctly proposed milking routine during milking and respect of biological needs of animals. The equipment should be adjusted so as to be stimulating (high pulsation rate) and optimize oxytocin release and increase drainage effectiveness and unaggressive (low vacuum pressure) to avoid tissue congestion and poor teat drainage, which would necessitate additional manual operations. A good management of milking is the way helping farmer to gain maximal milk production, good milk quality without a worsening udder health status.

**Keywords:** vacuum pressure, pulzation rate, labour input, mastitis

### ÚVOD

V poslednom období sa v literatúre uvádza a do praxe zavádza množstvo metód zlepšujúcich kvalitu a kvantitu dojeného mlieka. Väčšina z nich sa však venuje kŕmeniu a genetickému zlepšeniu úžitkovosti a zloženia mlieka. Nad spôsobom dojenia a technológiou dojacích zariadení sa manažment zamýšľa až sekundárne. Optimálne nastavenie dojacieho stroja a správne zvolená organizácia práce počas dojenia môže viesť nielen k uľahčeniu práce, ale aj k získaniu maximálneho množstva mlieka s dobrou kvalitou a bez následkov na zdravotnom stave zvierat.

### Frekvencia dojenia

Hoci pri ovciach môže byť uložené v cisterne aj viac ako 50 % z celkovej kapacity mlieka, čo je podstatne viac ako u kráv, napriek tomu je cisternové mlieko u oviec podobne ako u kráv pomerne chudobné na obsah tuku (Waldmann et al. 1999; McKusick et al. 2001b; McKusick et al.

2002). Pri porovnaní dojenia dva krát denne s jeden krát denne sa obsah tuku v mlieku významne nelíšil (Nuda et al. 2002). Avšak pri dojení jeden krát denne bol obsah bielkovín ako aj počet somatických buniek vyšší než pri zvieratách dojených dva krát (Negrao et al. 2001; Nuda et al. 2002;). Rozdielne výsledky, čo sa týka obsahu bielkovín zaznamenal McKusick et al. (2002). Ako sa interval medzi dojeniami zvyšoval, percento mliečného tuku sa znižovalo, kým percento mliečnych bielkovín a množstvo mliečného tuku a bielkovín sa zvyšovalo. Pri dlhších intervaloch než 4 h bolo percento alveolárneho mliečného tuku vyššie než percento cisternového mliečného tuku. To znamená, že percento alveolárneho tuku sa od 4 h do 24 intervalu zvyšuje, a percento cisternového tuku sa znižuje. Percento mliečnych bielkovín sa nelíši medzi cisternovými a alveolárnymi frakciami (McKusick et al. 2002). Avšak Negrao et al. (2001) zistili, že zvyšovanie frekvencie dojenia významne

zvýšilo produkciu mliečného tuku. Pritom došlo k znižovaniu obsahu bielkovín, no nie významne. Ovce dojené každých 12 h mali podobnú dĺžku laktácie, produkciu mlieka, tuku, proteínov a PSB ako ovce dojené každých 16 h (McKusick et al. 2002).

### Parametre dojacieho zariadenia

#### Frekvencia pulzácie

Hlavným cieľom výberu správnej pulzácie pri strojovom dojení je limitovanie vzniku prekrvenia, opuchov ceckového tkaniva a redukcia vzniku vnútrožľazovej infekcie (Mein, 1986). Výber správnej frekvencie pulzácie je dôležitý aj preto, aby proces dojenja čo najviac napodobňoval prirodzené podmienky pri cicaní jahňat (Marnet, 1997). Ovce sú zvyčajne dojené pri vyššej frekvencii pulzácie (120 do 180 pulzov.min<sup>-1</sup>), nižšom podtlaku (32 do 44 kPa) a rozdielnym pulzačným pomerom (50:50) ako kravy (Billon et al. 1999; Negro et al. 2001). Nižšie frekvencie pulzácie ako 120 pulzov.min<sup>-1</sup> negatívne ovplyvňujú vyvolanie reflexu ejakcie mlieka a tým spôsobujú nekompletné vydojenie bahnice počas strojového dojenja (Marnet et al. 1996; Marnet, 1997). Navyše pri dojení pri nižšej frekvencii môže dochádzať k častejšiemu padaniu ceckových nástrčiek (Marnet, 1997). Vplyv frekvencie pulzácie na ceckové tkanivo môže byť hodnotené meraním zmien hrúbky cecka (Hamann a Mein, 1988; 1996). Pri ovciach sa zmena hrúbky cecka pri pulzáciách 120 a 180 pulzov.min<sup>-1</sup> podstatne nezmenila. Peris et al. (2003b) pozorovali, že zmena rýchlosti pulzácie zo 120 na 180 pulzov.min<sup>-1</sup>, pri pulzačnom pomere 50:50 a podtlaku 36 kPa, nemá negatívny vplyv na zdravie vemena a nepoškodzuje zdravie ceckov. Pri oboch frekvenciách pulzácie došlo k približne rovnakej redukcii hrúbky cecka po dojení (od 0,1 po 0,5 mm) (Marnet et al. 1996; Peris et al. 2003b). Pri zdravých zvieratách tieto frekvencie pulzácie nemali vplyv na PSB v mlieku (Peris et al. 2003b).

#### Podtlak

Podtlak je považovaný za jeden z faktorov, ktorý zapríčiňuje zvyšovanie mastitíd a PSB u oviec. Ovce sú zvyčajne dojené s podtlakom od 36 do 44 kPa. Peris et al. (2003a) nezaznamenali žiaden stres alebo podráždenie oviec, ktoré by viedlo k nárastu PSB, keď porovnával podtlaky 36 a 42 kPa (pri frekvencii pulzácie 180 pulzov.min<sup>-1</sup>). Pri týchto podtlakoch nebol zistený nárast výskytu mastitíd ani pri dojení naprázdno 1,5 až 2 min. Síce boli pozorované signifikantné zmeny ceckového tkaniva medzi ovcami, ktoré boli dojené naprázdno a ovcami nedojenými naprázdno, ale autori nepredpokladajú, žeby to bolo spôsobené podtlakom. Vplyv podtlaku sa hlavne odzrkadľuje na podiele mlieka získaného pomocou dodávania. Toto môže byť zapríčinené narušením vývodného systému vyvolaného predĺžovaním cecka, šplhaním ceckovej gummy a veľmi zreteľnými edémami ceckov (Marnet, 1997).

#### Cecková guma

Jednou z najdôležitejších súčastí dojacieho stroja je cecková nástrčka, pretože je v priamom kontakte s mliečnou žľazou a svojou činnosťou na ňu bezprostredne pôsobí. Výberu správnej veľkosti ceckovej nástrčky ako aj kvality ceckovej gummy musí byť venovaná veľká

pozornosť, pretože obidva faktory môžu mať výrazný vplyv na vyprázdenie vemena. Zdá sa, že silikónové ceckové gummy redukujú padanie ceckových nástrčiek a kĺzanie ceckových gumm. Dodávanie je vysoko redukované, keď priemer ceckovej nástrčky je optimálny, aby sa obmedzilo vtlačenie cecka na konci dojenja. Inak vzduch dostávajúci do ceckovej nástrčky spôsobuje ich frekventovanejšie padanie. Veľmi tvrdá cecková guma môže značne zvyšovať trvanie dodávania, pretože sa pohybuje pomalšie a zostáva otvorená dlhšie ako mäkkšia cecková guma. Síce získavanie mlieka môže byť rýchlejšie, ale má to negatívny vplyv na cecok (vyššie prekrvenie) a spôsobuje to šplhanie ceckovej gummy (Marnet, 1997).

#### Organizácia práce pri strojovom dojení

Typický bežný pracovný postup pri dojení oviec sa skladá z nasadenia dojacej súpravy na cecky bez prípravy vemena, vlastného procesu dojenja a strojového alebo aj ručného dodávania (Masár, 1978; Billon, 1998).

Nasadzovanie dojacej súpravy závisí od skúseností a unavenosti obsluhy narastajúcej z časom dojenja (Masár, 1978). Priemerný čas strojového dojenja oviec závisí predovšetkým od plemena a štádia laktácie, veľkosti stáda, veľkosti dojárne, počtu dojičov a nastavenia podtlaku a pulzácie (Billon, 1998; Fernández et al. 1999; Mačuhová et al. 2007). Čas strojového dojenja by mal byť dostatočne dlhý nato, aby prebehol reflex ejakcie mlieka a bolo možné získať mlieko cisternové aj alveolárne z vemena bahnice (Mačuhová et al. 2008; Rovai et al. 2002).

Dodávanie je veľmi diskutabilnou časťou pracovného procesu dojenja. Dodávanie bahníc prebieha buď iba strojovo pomocou zaťaženia ceckových nástrčiek a masážou vemena alebo aj pomocou ručného dodávania. Strojové a / alebo ručné dodávanie je často praktizované počas strojového dojenja oviec na zlepšenie celkovej úžitkovosti a vyhnutiu sa ponechaniu veľkého množstva reziduálneho mlieka vo vemene (McKusick et al. 2001a). Dodávanie však zvyšuje únavu obsluhy a aj predlžuje proces dojenja (Billon, 1998; Masár, 1978). Dodávanie si vyžaduje pozornosť obsluhy pri každej ovci individuálne a tak môže neúmyselne nastať dojenie ostatných oviec naprázdno, hlavne pri nedostatočnom počte dojičov. Dojenie naprázdno môže viesť k poškodeniu ceckov a zvieratá sa stávajú náchylnejšie na vnútrožľazovú infekciu (Mein et al. 1986). U niektorých bahníc môže dodávanie viesť aj k návyku bahnice na tento úkon. Pri takýchto bahniciach dochádza potom k vyvolaniu reflexu ejakcie mlieka až pri kontakte rúk dojiča z vemenom (McKusick et al. 2001a). Množstvo mlieka získané dodávaním sa pohybuje od 10 do 30% v závislosti od plemena, stavby vemena, štádia laktácie, parity a podtlaku (Labussière, 1988; (McKusick et al. 2001a). Veľkosť vemena, tvar a typ sú determinované geneticky (Fernández et al., 1997) a hrajú dôležitú úlohu v uložení a získaní mlieka (Labussière, 1988). Vo všeobecnosti ovce s väčšími vemunami produkujú viac mlieka ako ovce s menšími vemunami. Ovce s väčšími cisternami (ktoré majú viac mlieka pod úrovňou ceckového kanálíka) sa dlhšie doja než ovce s menšími cisternami (McKusick et



al. 1999) a vyžadujú dodávanie. Pri bahniciach s menšími cisternami môže byť dodávanie v niektorých prípadoch eliminované pretože malé množstvo mlieka získané počas dodávania nestojí za pracovnú námahu vynaloženú pri jeho získavaní.

Výkonnosť dojárne je okrem faktorov týkajúcich sa samotných bahníc či nastavenia dojacej súpravy ovplyvnená množstvom dojacích miest, počtom obsluhujúcich osôb, od spôsobu výmeny zvierat a od spôsobu ukončovania dojenia (Mowlem, 1989; Tangorra et al. 2007).

## ZÁVER

Výber zvierat vysokoúžitkových plemien do chovov často krát neprináša také pozitívne výsledky ako chovateľ očakáva. Príčinou môže byť neoptimálne nastavenie parametrov dojacieho zariadenia prípadne jeho zlá kvalita ako aj zle zvolená organizácia práce počas dojenia. Prejaviť sa to môže na nedokonalom vydojení bahnice a jej postupnom zasúšaní, poranení hrotov ceckov alebo vemená, či vzniku mastitíd.

## LITERATÚRA

BILLON, P. 1998. Milking parlours and milking machines for dairy ewes. In *Proceeding of the Fourth Great Lakes dairy sheep symposium.*, Univ. Wisconsin – Madison, p. 18-31.

BILLON, P., RONNINGEN, O., SANGIORGI, F., SCHUILING, E. 1999. Quantitative requirements of milking installations for small ruminants. In F. Barillet and N.P. Zervas.: *Milking and milk production of dairy sheep and goats*. Proceedings of the Sixth International Symposium on the milking of small ruminants. EAAP Publication no. 95, 1999. p. 209-215.

FERNÁNDEZ, G., BARO, J. A., DE LA FUENTE, L. F., SAN PRIMITIVO, F. 1997. Genetic parameters for linear udder traits of dairy ewes. In *J. Dairy Sci.* vol. 80, 1997, p. 601-605.

FERNÁNDEZ, N., DÍAZ, J. R., PERIS, C., RODRÍGUEZ, M., MOLINA, M. P., D TORRES A. 1999. Machine milking parameters for the Manchega breed. In: F. Barillet and N.P. Zervas.: *Milking and milk production of dairy sheep and goat*, EAAP Publication no.95, Wageningen pers., Wageningen, p. 65–68.

HAMANN, J., MEIN G. A. 1988. Responses of bovine teat to machine milking: measurement of changes in thickness of the teat apex. In *J. Dairy Res.*, vol. 5, 1988, p. 331 – 338.

HAMANN, J., MEIN. G. A. 1996. Teat thickness changes may provide biological test for effective pulsation. In: *J. Dairy Res.*, vol. 63, 1996, p. 179-189.

LABUSSIÈRE J., 1988. Review of physiological and anatomical factors influencing the milking ability of ewes and the organization of milking. In *Livest. Prod. Sci.* vol. 18, 1988, p. 253-274.

MAČUHOVÁ, L., UHRINČAĎ, M., MAČUHOVÁ J., MARGETÍN, M., TANČIN, V. 2008. The first observation of milkability of the sheep breeds Tsigai, Improved Valachian and their crosses with Lacaune. In *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 12, 2008, p. 528-536.

MAČUHOVÁ, L., UHRINČAĎ, M., MARNET, P. G., MARGETÍN, M., MIHINA, Š., MAČUHOVÁ, J. -TANČIN, V. 2007. Reakcia bahníc na strojové dojenie: hodnotenie

priebehu toku mlieka. In *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 40, 2007, p. 89-96.

MARNET, P. G. 1997. Ewe management for improved milk yield and quality. In *Proceedings of the 3<sup>th</sup> Great Lakes dairy sheep symposium*, April 4th. 1997.,Madison, Wisconsin, USA, p. 5-11.

MARNET, P. G., COMBAUD, J. F., LE DU, J., DANO, Y. 1996. Effect of pulsation rate and vacuum level on oxytocin release, milk parameters and teat end reaction. In *Proceedings Symposium on Milk Synthesis, Secretion and Removal in Ruminants*, Bern, Switzerland, April 26 – 27, p. 114.

MASÁR, M. 1978. Effect of the length of the work process on the duration of work activities in the machine milking of ewes. In *Iiéme symposium international sur la traite mecanique des petits ruminants*, Alghero, Mai 22 – 27, 1978, p. 476-482.

MCKUSICK, B. C., BERGER, Y. M., THOMAS, D. L. 1999. Preliminary results: Effect of udder morphology on commercial milk production of East Friesian crossbred ewes. In *Proceedings 47<sup>th</sup> Annual Spooner Sheep Day*, p. 49 –60.

MCKUSICK, B. C. 2001a. Is machine stripping necessary for East Friesian dairy ewes? In *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Great Lakes dairy sheep Symposium*, November 1.-3. 2001, Guelph, Wisconsin, Canada, p. 116-128.

MCKUSICK, B. C., THOMAS, D. L., BERGER, Y. M. 2001b. Effect of reducing the frequency of milking on milk production, milk composition, and lactation length in East Friesian dairy ewes. In *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Great Lakes Dairy Sheep Symposium*, November 1.-3. 2001, Guelph, Wisconsin, Canada., p. 129-135.

MCKUSICK, B. C., THOMAS, D. L., BERGER, Y. M., MARNET, P. G. 2002. Effect of milking interval on alveolar versus cisternal milk accumulation and milk production and composition in dairy ewes. In *J. Dairy Sci.*, vol. 85, 2002, p. 2197-2206.

MEIN, G. A., BROWN, M. R., WILLIAMS, D. M. 1986. Effect on mastitis of overmilking in conjunction with pulsation failure. In *J. Dairy Res.*, vol. 53, 1986, p. 17-22.

MOWLEM, A. 1989. A moving abreast parlour for milking sheep and goats. In *Proceedings 4th International Symposium on Machine Milking of Small Ruminants*, Tel Aviv, Israel, September 13.–19. 1989, p. 173-178.

NUDDA, A., BENCINI, R., MIJATOVIC, S., PULINA, G. 2002. The yield and composition of milk in Sarda, Awassi, and Merino sheep milked unilaterally at different frequencies. In *J. Dairy. Sci.*, vol. 85, 2002, p. 2879–2884.

NEGRAO, J. A., MARNET, P. G., LABUSSIÈRE, J. 2001. Effect of milking frequency on oxytocin release and milk production in dairy ewes. In *Small Rum. Res.*, vol. 39, 2001, p. 181-187.

PERIS, C., DÍAZ, J. D., BALASCH, S., BELTRÁN, M. C., MOLINA, M. P., FERNÁNDEZ, N. 2003a. Influence of vacuum level and overmilking on udder health and teat thickness changes in dairy ewes. In *J. Dairy Sci.*, vol. 86, 2003, p. 3891–3898.

PERIS, C., DÍAZ, J. R., SEGURA, C., MARTÍ, A., FERNÁNDEZ, N. 2003b. Influence of pulsation rate on udder health and teat thickness changes in dairy ewes. In *J. Dairy Sci.*, vol. 86, 2003, p. 530-537

TANGORRA, F. M., ZANINELLI, M., MERCANDINO, L. 2007. Effect of automatic cluster removal on parlour performance and unit cost of milking in dairy goats. In *XXXIII Ciosta-Cigr Section V Conference "Advances in labour and*

*machinery management for a profitable agriculture and forestry*, 17- 19 September 2007, Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovakia, p. 639-646.

WALDMANN, A., ROSTAD, E., LANDSVERK, K., SORENSON, K., SOLVEROD, L., DAHL, E. 1999. Level and distribution of progesterone in bovine milk in relation to storage in the mammary gland. In *Anim. Reprod. Sci.* vol. 56, 1999, p. 19-21

**Kontaktná adresa:**

Ing. Lucia Mačuhová, doc. Ing. Vladimír Tančin, DrSc.,  
Ústav systémov chovu a pohody zvierat, Centrum  
výskumu živočíšnej výroby Nitra, Hlohovecká 2, SK-951  
41 Lužianky, tancin@scpv.sk

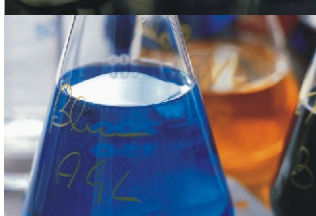
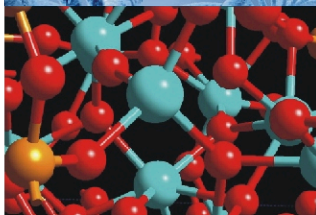
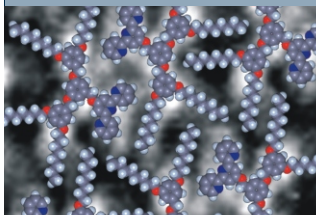
<b>JAROSLAV ANDREJI, IVAN STRÁŇAI, PAVEL NAĎ, MAGDALÉNA SKALICKÁ</b> ÚROVEŇ KONTAMINÁCIE SVALOVINY RÝB ŤAŽKÝMI KOVMI NA HORNEJ NITRE ..... 1	<b>AGNEŠA LUKAČÍNOVÁ, OLIVER RÁCZ, FRANTIŠEK NIŠTIAR</b> EFFECT OF LIFETIME LOW-DOSE EXPOSURE WITH HEAVY METALS ON SELECTED PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS..... 43
<b>A. BEHBAHANINIA, S. A. MIRBAGHERI, N. KHORASANI J. NOURI, A. H. JAVID</b> IMPACT OF IRRIGATION WITH EFFLUENT AND SEWAGE SLUDGE ON HEAVY METAL CONTENT IN CROPS ..... 3	<b>JANA MAKOVÁ, ZUZANA SELEŠIOVÁ, SOŇA JAVOREKOVÁ</b> MIKROBIOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA PŮDY PO APLIKÁCIÍ BIOKALU Z BIOPLYNOVEJ STANICE KOLÍŇANY ..... 48
<b>IZABELA BERTKOVÁ, DARINA PETRÁŠOVÁ</b> FERMENTOVANÉ PRODUKTY VO VÝŽIVE ADOLESCENTOV.. ..... 7	<b>EVA MARGITANOVÁ, ALENA VOLLMANNOVÁ, LÍVIA KRÍŽOVÁ, GABRIELA SZABÓOVÁ, ĽUBOŠ HARANGOZO</b> KUMULÁCIA RIZIKOVÝCH KOVOV ZRNOM PSEUDOCEREÁLII..... 51
<b>MARCELA CAPCAROVÁ, NORBERT LUKÁČ, JURAJ PIVKO, ĽUBOMÍR ONDRUŠKA, PETER MASSÁNYI, ADRIANA KOLESÁROVÁ</b> EFFECT OF EXPOSURE TO HIGH AMBIENT TEMPERATURE ON SELECTED BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RABBITS..... ..... 10	<b>MONIKA MARTINIAKOVÁ, RADOSLAV OMELKA, ALENA JANČOVÁ, GRZEGORZ FORMICKI, ROBERT STAWARZ</b> KONCENTRÁCIA VYBRANÝCH RIZIKOVÝCH PRVKOV V STEHNOVÝCH KOSTIACH HRDZIAKA HÔRNEHO ( <i>CLETHRIONOMYS GLAREOLUS</i> )..... 54
<b>IVETA CIMBOLÁKOVÁ, JAROSLAVA NOVÁKOVÁ</b> ŤAŽKÉ KOVY – VÝZNAMNÁ ZLOŽKA POTRAVOVÉHO REŤAZCA ..... 14	<b>FRANTIŠEK NIŠTIAR, AGNEŠA LUKAČÍNOVÁ, ROBERT BEŇAČKA</b> EFFECT OF LIFETIME LOW-DOSE EXPOSURE WITH CADMIUM DURING THREE FILIAL GENERATION OF WISTAR RATS ..... 57
<b>RÓBERT GERMUŠKA, JOZEF GOLIAN</b> OPTIMALIZOVANIE HPLC SEPARÁCIE 15+1 EÚ PRIORITNÝCH PAU ..... 17	<b>JAROSLAVA NOVÁKOVÁ, IVETA CIMBOLÁKOVÁ</b> VPLYV RÔZNYCH KONCENTRÁCIÍ ZINKU A KADMIA NA LETALITU ARTEMIA FRANCISCANA ..... 62
<b>EMÍLIA HIJOVÁ, ANNA CHMELÁROVÁ, ALOJZ BOMBA</b> BIOMODULAČNÝ ÚČINOK INULÍNU V EXPERIMENTE ..... 22	<b>MONIKA SCHNEIDGENOVÁ, PETER CHRENEK, ANNA KALAFOVÁ, PETER MASSÁNYI, NORBERT LUKÁČ</b> HYPERTERMIA A JEJ VPLYV NA POHYBLIVOSŤ KRÁLIČÍCH SPERMIÍ..... 65
<b>KATARÍNA HOLOVSKÁ JR., VIERA ALMÁŠIOVÁ, VIERA CIGÁNKOVÁ, EVA PETROVOVÁ</b> VPLYV KADMIA NA HISTOLOGICKÉ ZMENY V PEČENI MORIEK..... 26	<b>KATARÍNA FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, ALENA GREGUŠOVÁ</b> NEDOSTATKY V STRAVOVACÍCH ZVYKLOSTIACH ŠTUDENTOV STREDNÝCH ŠKŔOL..... 67
<b>ELIZA CHODKOWSKA, BERNADETTA ŚWIĄTEK, ALICJA ZACHARA</b> ORGANOCHLORINE PESTICIDES AS FOOD CHAIN RISK FACTORS ..... 28	<b>IRENA ŠUTIÁKOVÁ, BEÁTA KORENÉKOVÁ, MAGDALÉNA SKALICKÁ, PAVOL NAĎ, NATALIA KOVALKOVIČOVÁ</b> INDUKCIA MIKROJADIER V KOSTNEJ DRENI PREPELÍC PO PÔSOBNÍ KADMIA A ZINKU ..... 71
<b>KATARZYNA KILIAN, ZOFIA GOC, GRZEGORZ FORMICKI, ROBERT STAWARZ</b> INFLUENCE OF SMOKING ON MERCURY CONTAMINATION OF BREAST MILK IN RELATION WITH AGE OF NURSING WOMEN FROM SOUTHERN POLAND ..... 32	<b>JAN TRÁVNÍČEK, IVAN HERZIG, VLASTA KROUPOVÁ, HELENA PEŠINOVÁ, ROMAN KONEČNÝ</b> IODINE CONTENT IN COW MILK IN THE CZECH REPUBLIC... ..... 75
<b>NORBERT LUKÁČ, PETER MASSÁNYI, MARCELA CAPCAROVÁ, JAROSLAV KOVÁČIK, MONIKA MARTINIAKOVÁ,</b> VPLYV TOXICKÝCH KOVOV NA IMUNITNÝ SYSTÉM ..... 35	<b>BARBARA PINTO, DANIELA REALI</b> NEW PERSPECTIVES IN FOOD SAFETY: EXPOSURE OF THE POPULATION TO ESTROGENIC CHEMICALS ..... 78
<b>ŠTEFAN LUKAČÍN, AGNESA LUKAČÍNOVÁ</b> ANIMÁLNE MODELY V KARDIOLÓGII Z POHĽADU KARDIOCHIRURGA ..... 39	<b>LUCIA MAČUHOVÁ, DANA TANČINOVÁ, JULIANA MAČUHOVÁ, VLADIMÍR TANČIN</b> VPLYV MANAŽMENTU DOJENIA NA ZDRAVIE VEMENA BAHNÍC, KVALITU A KVANTITU MĽIEKA ..... 81



LAMBDA LIFE

### Lambda Life a.s.

Levočská 3  
851 01 Bratislava 5  
Slovenská republika  
Tel.: 02 / 4488 0160  
Fax: 02 / 4488 0165  
[info@lambda.sk](mailto:info@lambda.sk)



# Lambda Life a.s.

## PROTEOMIKA, PEPTIDY NA ZÁKAZKU & ANTISÉRA

- FLAG<sup>®</sup>, HIS-Tag a MAT-Tag Technológia purifikácie proteínov
- hmotnostná spektrometria ProteoMass-MALDI MS kalibračné roztoky a kity, matrice pre MALDI analýzu, Protease Profiler, Trypsin a Guanidination kity
- extrakčné kity a reagenty na izoláciu celkových proteínov a proteínových frakcií, kity pre izoláciu organel
- post - translačná a 2D analýza proteínov
- expresia rekombinantných proteínov

## GENOMIKA, OLIGONUKLEOTIDY NA ZÁKAZKU & SEKVENAČNÁ SLUŽBA

- PCR technológia a amplifikácia celých genómov
- reagenty pre molekulárnu biológiu
- klonovanie a expresia
- DNA a RNA purifikácia

## FUNKČNÁ GENOMIKA & RNAI

- **gene silencing** - siRNA, shRNA, lentivirálne systémy
- TargeTron Gene Knockout System pre rýchlu a špecifickú disrupciu génov v prokaryotických organizmoch, kity na mutagenézu
- microRNAs

## BUNKOVÁ BIOLÓGIA, PROTILÁTKY & INHIBÍTORE

- viac ako 4,000 vysoko kvalitných protilátok
- výskum v oblasti Neuroscience, Bunkovej signalizácie a Signálnej transdukcie

## BUNKOVÉ KULTÚRY

- bunkové línie z Európskej kolekcie bunkových kultúr (ECACC)
- široká ponuka práškových a tekutých médií
- antibiotiká od A po Z, suplementy do médií, fetal bovine serum a iné séra
- výskum kmeňových buniek

## BUNKOVÉ ŠTÚDIE

- štúdium bunkových signálnych dráh

- štúdium apoptózy
- sledovanie viability buniek, bunkovej proliferácie a cytotoxicity

## BLOTOVACIE MEMBRÁNY A SUBSTRÁTY PRE WESTERN BLOTTING

- blotovacie membrány z čistej nitrocelulózy a PVDF
- kolorimetrické a chemiluminiscenčné substráty

## FILTRÁCIA

- **sterilná filtrácia** - sterilné striekačkové filtre, sterilné filtračné jednotky na sterilizáciu médií, membránové filtre
- **nesterilná filtrácia** - nesterilné striekačkové filtre, membránové filtre
- **filtračné zostavy**
- **ultrafiltračné centrifugačné jednotky** na zahusťovanie, odsoľovanie proteínových vzoriek a výmenu tlmivých roztokov

## PRÍSTROJE

- **kompletné vybavenie PCR laboratória** - termocykléry Biometra, PCR boxy, elektroforézy
- **bežné laboratórne prístroje a vybavenie** - vortexy, trepačky, centrifúgy Hettich, váhy, pipety, miešadlá.....
- **zariadenia na prípravu čistej a ultračistej vody od firmy Millipore**
- **vybavenie laboratória pre bunkové kultúry** - laminárne a biohazard boxy II tr. od firmy ESCO, inkubátory

## CHROMATOGRAFICKÉ SYSTÉMY OD FIRMY WATERS

- **systém pre analýzu aminokyselín** - UPLC s UV-VIS detektorom
- **systém pre analýzu oligonukleotidov** - Waters BioAlliance 2796 s PDA detektorom
- **systémy pre komplexnú analýzu proteínov (identifikácia aj charakterizácia)** - LC/MS, LC/MS/MS

# www.lambda.sk