

Małgorzata DŻUGAN<sup>1</sup>, Marcin LIS<sup>2</sup>, Joanna HEĆLIK<sup>1</sup>, Hanna LUTNICKA<sup>2</sup>  
Maria DROBA<sup>1</sup> i Jerzy W. NIEDZIÓŁKA<sup>2</sup>

## BADANIA *IN OVO* NAD EMBRIOTOKSYCZNOŚCIĄ KADMU I POSZUKIWANIE SUBSTANCJI OCHRONNYCH

### THE *IN OVO* STUDY OF CADMIUM EMBRYOTOXICITY AND THE SEARCH FOR PROTECTORS

**Abstrakt:** Kadm, toksyna środowiskowa o wysokiej zdolności do bioakumulacji i szerokim spektrum działania, stanowi realne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Zastosowanie modelu *in ovo* w badaniach nad toksycznością kadmu pozwala na ocenę skutków narażenia rozwijających się zarodków kurzych na kadm, a ponadto stwarza idealny scenariusz do poszukiwania jego skutecznych protektorów. Zaletą modelu jest wyeliminowanie wpływów środowiskowych i żywienia, a przede wszystkim dostępność i niskie koszty eksperymentu. Przeprowadzone badania pozwoliły ocenić skutki rosnącej ekspozycji na kadm, wprowadzony do białka jaja w 4. dobie inkubacji (w dawce 0-24 µg Cd/jajo), dla rozwoju zarodków kurzych. Oceniano śmiertelność, wady rozwojowe, a także zmiany biochemiczne w narządach piskląt. Analiza aktywności lizosomalnej N-acetyloglukozaminidazy wykazała, że ekspozycja na kadm prowadzi do uszkodzenia nerek i wątroby piskląt. Stwierdzono, że równoczesne podanie kadmu z antagonistycznym cynkiem lub chelatującym tiolem (w wielokrotnie wyższym stosunku molowym) ogranicza jego embriotoksyczność dla ptaków.

**Słowa kluczowe:** kadm, embriotoksyczność, model *in ovo*, substancje ochronne

Rozwój cywilizacyjny, a przede wszystkim powszechna chemizacja wszystkich dziedzin życia są przyczyną gwałtownego wzrostu problemów środowiskowych związanych z zakłóceniem równowagi ekologicznej. Toksyczne substancje chemiczne wprowadzane do powietrza, wody i gleby przedostają się ze środowiska do łańcucha pokarmowego człowieka. Ich włączenie w system biologiczny, w wyniku naruszenia procesów biochemicznych, prowadzi do groźnych zaburzeń zdrowotnych. Wśród pierwiastków śladowych, obok tych pełniących wiele funkcji fizjologicznych, ze skażonego środowiska przenikają też metale ciężkie (kadm, rtęć, ołów), wykazujące działanie toksyczne dla żywych organizmów.

Kadm (Cd) występuje jako zanieczyszczenie środowiska pochodzące ze źródeł przemysłowych i rolniczych. Ze względu na rosnące zastosowanie przemysłowe, m.in. w produkcji baterii kadmowo-niklowych, barwników (siarczek kadmu) i stabilizatorów do tworzyw sztucznych (stearynian kadmu), stwarza realne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt [1].

Dla ogólnej populacji niepalących żywność jest głównym źródłem narażenia na kadm. Wdychanie kadmu z dymem tytoniowym lub wchłanianie drogą pokarmową z różnych źródeł prowadzi do jego kumulacji w organizmie człowieka, ponieważ metal ten wykazuje długi biologiczny okres półtrwania (10-30 lat) [2]. Toksyczność kadmu zależy od dawki, drogi i czasu trwania ekspozycji i jest ostatnio szczegółowo badana [3-6]. Ekspozycja,

<sup>1</sup> Katedra Chemii i Toksykologii Żywności, Uniwersytet Rzeszowski, ul. M. Œwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów, tel. 17 872 16 19, email: mdzugan@ur.edu.pl

<sup>2</sup> Zakład Weterynarii, Rozrodu i Dobrostanu Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, al. A. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, tel. 12 662 41 12, email: rzlis@cyf-kr.edu.pl

\*Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'14, Jarnołtówek, 15-17.10.2014

także przewlekła, na związki kadmu jest przyczyną występowania nowotworów płuc, nerek, prostaty, piersi. Najnowsze dane, dotyczące chronicznego narażenia populacji ogólnej na kadm, wskazują na zwiększone ryzyko zachorowania na nowotwory, zwłaszcza hormonozależne [7].

### **Mechanizmy toksyczności kadmu**

Zaproponowano i udowodniono wiele mechanizmów toksycznego działania kadmu na organizmy żywe. Najszerzej rozważane były:

- indukcja stresu oksydacyjnego,
- uszkodzenie mitochondriów i zahamowanie produkcji ATP,
- wpływ na system informacyjny komórki (hamowanie procesów naprawy DNA),
- indukcja karcynogenezy (modyfikacja E-kadheryn),
- indukcja apoptozy komórki,
- destabilizacja błon lizosomalnych,
- hamowanie aktywności wielu enzymów, m.in. cyklu Krebsa,
- zakłócenie przemian wapnia i fosforu w tkance kostnej,
- zmniejszenie elastyczności ścian tętnic,
- zakłócenia czynności hormonalnej nerek, nadnerczy, gonad („endocrine disruptor”),
- zaburzenie metabolizmu: Fe, Cu, Zn,
- zaburzenia w metabolizmie białek oraz witamin B1 i D [2, 3].

Mimo że kadm należy do metali oksydoredukcyjnie nieaktywnych, narusza równowagę redox komórki, indukując stres oksydacyjny w sposób pośredni poprzez:

- wypieranie metali aktywnych oksydoredukcyjnie, tj. Fe, Cu, Cr, które mogą bezpośrednio katalizować wytwarzanie rodnika hydroksylowego z nadtlenku wodoru w reakcji Fentona,
- spadek poziomu wewnątrzcząsteczkowych neutralizatorów wolnych rodników (glutation-GSH, witaminy C, E),
- inhibicję enzymów antyoksydacyjnych, które biorą udział w metabolizmie i neutralizacji reaktywnych form tlenu, tj. peroksydaza-GSH, reduktaza-GSH, katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa,
- zahamowanie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym - uszkodzenie mitochondriów [3].

Ze względu na długi okres półtrwania kadm jest uważany za ksenobiotyk kumulujący się w organizmie i częściej wywołujący zatrucia przewlekłe niż ostre. Narząd docelowy toksycznego działania kadmu zależy od rodzaju ekspozycji. W przypadku zatrucia ostrego w wyniku inhalacji związków kadmu głównym celem toksycznego działania są płuca, wdychanie kadmu może prowadzić do przewlekłej obturacyjnej choroby dróg oddechowych [2, 3]. W przypadku zatrucia chronicznego, zarówno drogą inhalacyjną, jak i doustną, najbardziej narażone na uszkodzenia są nerki [8]. Oprócz zaburzeń ich funkcjonowania, dochodzi także do licznych uszkodzeń strukturalnych cewek proksymalnych, gdzie organellami najbardziej wrażliwymi na toksyczne efekty są mitochondria. Metal gwałtownie gromadzi się w tych strukturach, prawdopodobnie dostaje się tam przez kanał wapniowy błony wewnętrznej mitochondrium, a następnie wiąże się

z białkami transportującymi elektrony i hamuje fosforylację oksydacyjną, proces fundamentalny dla oddychania komórkowego [3].

Najwcześniejszymi objawami uszkodzenia kanalików są: zwiększone wydalanie białek o niskiej masie cząsteczkowej, tj.  $\beta$ 2-mikroglobuliny ( $\beta$ 2-M) i  $\alpha$ 1-mikroglobuliny ( $\alpha$ 1-M), białka wiążącego retinol (RBP) oraz markerów lizosomalnych, w tym N-acetyloglukozaminidazy (NAG) [2]. U ludzi enzym ten stosowany jest do oceny narażenia chronicznego na kadm [9, 10]. W komórce NAG jest usytuowana głównie w lizosomach. Wzrost przepuszczalności błon lizosomalnych, indukowany przez kadm, może powodować wyciek enzymów lizosomalnych do cytoplazmy, a następnie do krwi.

### Strategie obronne

Kadm wykazuje toksyczność wyłącznie w zjonizowanej formie. Dlatego podstawowy mechanizm detoksykacji kadmu na poziomie komórkowym odbywa się przy udziale niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy i metalotioneiny - białka, którego syntezę indukuje kadm. Glutation (GSH) jest uważany za pierwszą linię obrony przeciwko toksyczności Cd, a mechanizm jego ochronnego działania jest dobrze zbadany [11]. Ponadto wykazano, że N-acetylocysteina (NAC), prekursor glutationu, może chronić wątrobę i nerkę przed uszkodzeniami w warunkach ekspozycji na kadm [12].

Odrębny mechanizm działania ochronnego oparty jest na interakcjach międzypierwiastkowych. Wydajność absorpcji kadmu w dużym stopniu zależy od stanu zaopatrzenia organizmu w inne pierwiastki, takie jak żelazo czy cynk. Deficyt tych pierwiastków może powodować zwiększenie wchłaniania i akumulacji kadmu [1]. Kadm, na zasadzie podobieństwa chemicznego, tzw. „mimikry jonowej”, wchłaniany jest przez przenośniki specyficzne dla niezbędnych fizjologicznie jonów metali dwuwartościowych, takich jak: Fe(II), Zn(II) i Ca(II) [13]. Badania prowadzone na zwierzętach sugerują, że zwiększona podaż niektórych biopierwiastków może łagodzić efekty toksycznego działania kadmu, a nawet im całkowicie zapobiegać. Wiadomo, że absorpcja kadmu ze środowiska może być ograniczana przez ochronny wpływ nadmiaru takich pierwiastków, jak: Zn, Mn, Ca, Mg, Se [14, 15]. Szczególną rolę ochronną w przypadku narażenia na kadm pełni cynk (Zn), który jest uznanym przeciwutleniaczem, zmniejszającym produkcję reaktywnych form tlenu.

### Zastosowanie modelu *in ovo* w badaniach toksyczności kadmu

Zarodek kurzy jest dobrze znanym modelem biologicznym, stosowanym w badaniach toksykologicznych i farmaceutycznych, głównie ze względu na dostępność i niskie koszty eksperymentu [16]. Podstawową zaletą tego modelu jest: krótki okres inkubacji i niezależność od wpływów środowiskowych. Jajo zapewnia wszystkie składniki odżywcze niezbędne dla wzrostu i rozwoju zarodka, co stwarza doskonały scenariusz do testowania wpływu dodatkowych czynników, wprowadzanych metodą iniekcji do jaja (technika *in ovo*) na przebieg embriogenezy.

Badania *in ovo* pozwalają na szybką i skuteczną ocenę toksyczności ostrej wielu ksenobiotyków środowiskowych, a także dzięki wykorzystaniu specyficznych biomarkerów na ocenę skutków ekspozycji przewlekłej. W zależności od rodzaju ksenobiotyku można go podawać w różnych ilościach, w różnych stadiach rozwoju i do różnych przedziałów jaja.

W związku z tym mogą być prowadzone badania porównawcze w takich samych warunkach z ograniczeniem wpływów środowiskowych, genetycznych, diety i sezonu, a przede wszystkim czaso- i kosztochłonności eksperymentu. Efekt czynnika toksycznego może być oceniany na różnych etapach rozwoju zarodka z równoczesnym zastosowaniem analiz makroskopowych (do wykrywania wad rozwojowych lub śmiertelności), analiz histologicznych, molekularnych i immunohistochemicznych oraz specyficznych markerów enzymatycznych [17].

### **Badania *in ovo* nad skutecznością protektorów**

W badaniach własnych wykorzystano model *in ovo* w celu określenia wpływu kadmu na embriogenezę zarodków kurzych oraz zbadania możliwości ochronnego działania cynku i N-acetylocysteiny podanych równocześnie z kadmem.

*Eksperyment I:* Iniekcję 50 mm<sup>3</sup> roztworu jonów Cd(II) w rosnącej dawce 0-24 µg/jajo, do białka zapłodnionych jaj kurzych linii Ross 308, przeprowadzono w 4. dniu inkubacji, stosując min. 50 jaj/grupę. Oceniano śmiertelność i wady rozwojowe zamarych zarodków. W osoczu krwi oznaczano aktywność NAG metodą spektrofotometryczną z użyciem 4-nitrophenylo-N-acetylo-β-D-glukozaminidu (Sigma Aldrich, USA) jako substratu [18].

*Eksperyment II:* Jaja wylęgowe podzielono na 6 grup eksperymentalnych (40 jaj/grupę), w 4. dobie inkubacji do białka jaj wprowadzono metodą iniekcji toksyczną dawkę jonów kadmu i/lub ochronną dawkę jonów cynku w objętości 50 mm<sup>3</sup> soli fizjologicznej:

Cd:	50 nmol Cd <sup>2+</sup> (czyli 6 µg Cd/jajo)
Cd+2 Zn:	50 nmol Cd <sup>2+</sup> + 100 nmol Zn <sup>2+</sup>
Cd+10 Zn:	50 nmol Cd <sup>2+</sup> + 500 nmol Zn <sup>2+</sup>
2 Zn:	100 nmol Zn <sup>2+</sup>
10 Zn:	500 nmol Zn <sup>2+</sup>
Kontrolna:	sól fizjologiczna

Oceniano wyniki łęgu i poziom aktywności NAG we krwi jednodniowych piskląt [19].

*Eksperyment III:* Jaja wylęgowe podzielono na 6 grup eksperymentalnych (40 jaj/grupę), w 4. dobie inkubacji do białka jaj wprowadzono metodą iniekcji toksyczną dawkę jonów kadmu i/lub ochronną dawkę N-acetyloglukozaminy (NAC) w objętości 50 mm<sup>3</sup> soli fizjologicznej:

Cd:	50 nmol Cd <sup>2+</sup>
Cd+50 NAC:	50 nmol Cd + 2,5 µmol NAC
Cd+200 NAC:	50 nmol Cd + 10 µmol NAC
50 NAC:	2,5 µmol NAC
200 NAC:	10 µmol NAC
Kontrolna:	sól fizjologiczna

Oceniano wyniki łęgu i poziom aktywności NAG we krwi jednodniowych piskląt.

Eksperymenty przeprowadzono zgodnie z zezwoleniem I Lokalnej Komisji Etycznej w Lublinie (nr 9/2011).

Wyniki uzyskane w ramach Eksperymentu 1 (tab. 1), polegającego na wprowadzeniu kadmu do białka jaja metodą iniekcji od strony komory powietrznej, wskazują, że wraz z

zwiększającą się dawką kadmu stopniowo spada wylęgowość (od 45% w grupie kontrolnej do 0% dla dawki 24  $\mu\text{g}/\text{jajo}$ ), przy czym najintensywniejszy wzrost zamieralności zarodków obserwowano bezpośrednio po iniekcji. Wyznaczona metodą Kräbera dawka letalna  $\text{LD}_{50}$  wynosiła 3,9  $\mu\text{g}/\text{jajo}$ . Analiza embriopatologiczna zarodków z jaj wybrakowanych i niewyklutych w grupie narażonej na 6  $\mu\text{g}$  Cd wykazała występowanie wad rozwojowych, w tym karłowatość, deformację kończyn, deformacje w obszarze głowy [18].

Tabela 1

Toksyeczność kadmu dla zarodków kurzych i ochronne działanie cynku oraz N-acetylocysteiny

Table 1

Cadmium toxicity for chick embryos and protective action of zinc and N-acetylcysteine

<b>Eksperyment <i>in ovo</i></b>	<b>Wylęgowość [%]</b>	<b>Masa wątroby/ Masa ciała [%]</b>	<b>Aktywność N-acetyloglukozaminidazy w krwi 1-dniowych kurcząt [mU/cm<sup>3</sup>]</b>
<b><i>Eksperyment 1</i></b>			
<i>Kontrola</i>	45,0% <sup>a</sup>	1,62 <sup>a</sup>	34 ±7 <sup>a</sup>
1 $\mu\text{g}$ Cd	51,3% <sup>a</sup>	1,78 <sup>b</sup>	25 ±1 <sup>a</sup>
3 $\mu\text{g}$ Cd	20,0% <sup>b</sup>	1,82 <sup>b</sup>	52 ±8 <sup>b,c</sup>
6 $\mu\text{g}$ Cd	19,5% <sup>b</sup>	1,98 <sup>c</sup>	68 ±10 <sup>b,d</sup>
12 $\mu\text{g}$ Cd	7,5% <sup>c</sup>	1,69 <sup>a</sup>	45 ±7 <sup>a,c,d</sup>
24 $\mu\text{g}$ Cd	0,0% <sup>d</sup>	-	-
<b><i>Eksperyment 2</i></b>			
<i>Kontrola</i>	61,9% <sup>a</sup>	1,76 <sup>a</sup>	87 ±22 <sup>a</sup>
Cd	30,2% <sup>b</sup>	1,91 <sup>b,c</sup>	92 ±20 <sup>a</sup>
Cd+2 Zn	43,2% <sup>b,c</sup>	1,93 <sup>b,c</sup>	106 ±41 <sup>a</sup>
Cd+10 Zn	48,9% <sup>a,c</sup>	2,00 <sup>c</sup>	80 ±31 <sup>a</sup>
2Zn	47,6% <sup>a,c</sup>	1,84 <sup>a,b</sup>	85 ±49 <sup>a</sup>
10Zn	60,9% <sup>a</sup>	1,84 <sup>a,b</sup>	94 ±36 <sup>a</sup>
<b><i>Eksperyment 3</i></b>			
<i>Kontrola</i>	60,5% <sup>a</sup>	1,86 <sup>a</sup>	69 ±10 <sup>a</sup>
grupa Cd	2,5% <sup>b</sup>	1,96 <sup>b</sup>	100 ±19 <sup>b</sup>
Cd+50 NAC	0,0% <sup>b</sup>	1,92 <sup>a,b</sup>	110 ±14 <sup>a,b</sup>
Cd+200 NAC	42,5% <sup>c</sup>	1,85 <sup>a</sup>	79 ±3 <sup>a</sup>
50 NAC	60,0% <sup>a,d</sup>	1,88 <sup>a</sup>	62 ±15 <sup>a,c</sup>
200 NAC	48,7% <sup>d</sup>	1,90 <sup>a</sup>	58 ±22 <sup>c</sup>

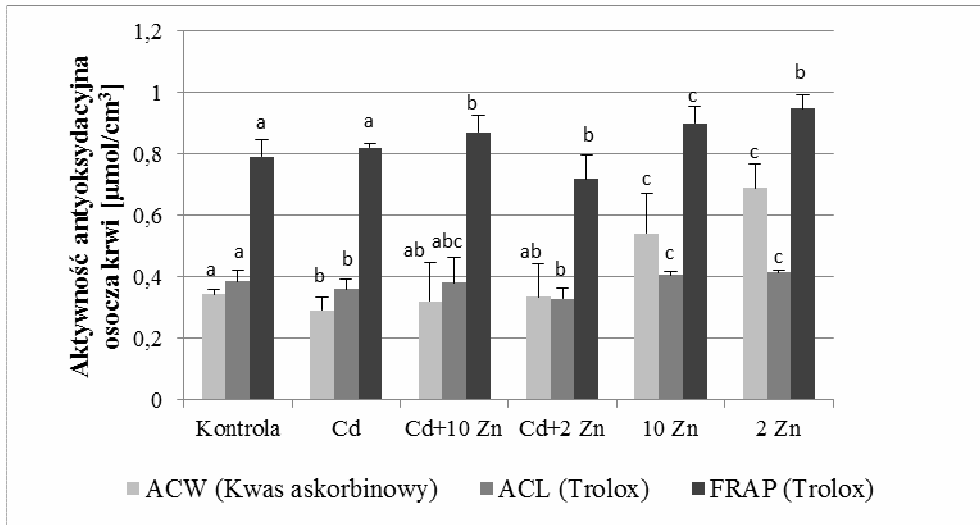
<sup>a,b</sup> Średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie dla danego eksperymentu są statystycznie różne ( $P < 0,05$ )

We krwi wylęzonych piskląt stwierdzono istotny ( $P < 0,05$ ) wzrost aktywności NAG skorelowany z dawką kadmu (tab. 1). Obserwowane zmiany mogą być wynikiem uszkodzenia narządów wewnętrznych, a wyciek tego enzymu lizosomalnego do krwi wskazuje na destabilizację lizosomów wewnątrz komórki. Eliminacja białka enzymatycznego z krwi odbywa się w wątrobie, której praca także ulega zakłóceniu przez kadm. Potwierdza to obserwowany podczas rosnącej ekspozycji wzrost masy wątroby standaryzowanej względem masy ciała (tab. 1).

Eksperyment 2, polegający na równoczesnym podaniu do jaj kurzych kadmu (w dawce 6  $\mu\text{g}/\text{jajo}$ ) i cynku (w stosunku molowym 2- i 10-krotnie wyższym niż kadm), przeprowadzono w celu wykazania ochronnego działania cynku (tab. 1). Analiza wyników łęgu wykazała wzrost wylęgowości przy równoczesnym podaniu kadmu z rosnącą dawką

ochronną cynku o 17,5 i 30,7% w stosunku do grupy kadmowej. Cynk podany oddzielnie w najwyższej zastosowanej dawce nie wpłynął na wyniki lęgu w porównaniu z grupą kontrolną, odpowiednio 60,9 i 61,9% wylęgu. Analiza aktywności enzymu markerowego (NAG) w osoczu krwi jednodniowych piskląt nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami.

W ramach wyjaśnienia mechanizmu ochronnego działania cynku w warunkach narażenia na kadm badano status antyoksydacyjny osocza krwi wylężonych piskląt (rys. 1).



Rys. 1. Aktywność antyoksydacyjna osocza krwi 1-dniowych piskląt narażonych na działanie kadmu i/lub cynku podczas embriogenezy

Fig. 1. Antioxidant capacity of blood plasma of 1-day old chicks expose to cadmium and/or zinc during embryogenesis

Po raz pierwszy zastosowano metodę fotochemiluminescencji (PCL) z wykorzystaniem zestawów do oceny hydrofilowej (ACW) i lipofilowej (ACL) frakcji antyoksydantów, stosując jako referencyjną metodę FRAP. Wykazano, że narażenie na kadm powoduje spadek aktywności antyoksydacyjnej (głównie frakcji antyoksydantów hydrofilowych) osocza piskląt, który był niwelowany przez podaną równocześnie ochronną dawkę cynku. Ponadto iniekcja samego cynku zwiększała istotnie aktywność antyoksydacyjną osocza krwi. Badania potwierdziły większą czułość metody PCL w stosunku do metody FRAP oraz jej przydatność do analizy równowagi antyoksydacyjnej organizmu.

W Eksperymentie 3, polegającym na równoczesnym podaniu do jaj kurzych kadmu (w dawce 6 μg/jajo) i N-acetylocysteiny (w stosunku molowym 50- i 200-krotnie wyższym niż kadm), ochronne działanie NAC obserwowano wyłącznie dla najwyższej dawki (Cd: NAC w stosunku molowym 1: 200), gdzie śmiertelność zarodków zmniejszyła się o 40% ( $P > 0,05$ ) w porównaniu do grupy kadmowej i była o 18% niższa niż w grupie kontrolnej (62,5%). Ta sama dawka NAC podana oddzielnie wykazywała działanie

toksyczne dla zarodków, wylęgowość zmniejszyła się o 11,8% w stosunku do grupy kontrolnej. Obserwowana wysoka śmiertelność zarodków w grupie kadmowej wydaje się wskazywać na zróżnicowaną wrażliwość zarodków kurzych na kadm. Może to być związane, przy zachowaniu niezmienności pozostałych parametrów eksperymentu *in ovo*, z niejednorodnością materiału badawczego wywołaną przez czynniki środowiskowe (żywienie, pora roku) lub genetyczne [20].

## Wnioski

1. Model *in ovo* pozwala na szybką ocenę toksycznego działania kadmu i umożliwia równoczesne testowanie substancji działających ochronnie.
2. Kadm zakłóca przebieg embriogenezy u ptaków, obserwowano istotne, skorelowane z poziomem narażenia, obniżenie wyników lęgu i pogorszenie stanu fizjologicznego pozyskanych piskląt. Skażenie jaj na terenach przemysłowych, przekraczające wyznaczoną dawkę LD<sub>50</sub> 3,9 µg/jajo, może stanowić zagrożenie dla rozrodu ptaków dziko żyjących.
3. Aktywność N-acetyloglukozaminidazy może być wskaźnikiem narażenia ptaków na kadm i znajduje wykorzystanie do oceny efektywności stosowanych protektorów.
4. Obecność cynku lub N-acetylocysteiny w stosunku molowym przekraczającym wielokrotnie dawkę kadmu ogranicza jego toksyczność, przy czym cynk jest bardziej efektywnym protektorem kadmu.

## Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków projektu NN 304 291 140.

## Literatura

- [1] Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friedmann JM. Cadmium. In: Handbook on the Toxicology of Metals. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L, editors. Amsterdam: Elsevier; 2007; 445-486.
- [2] Krzywy I, Krzywy E, Peregud-Pogorzelski J, Łuksza K, Brodkiewicz A. Cadmium - Is there something to fear? *Ann Acad Med Stetin*. 2011;57(3):49-63. [http://www.pum.edu.pl/\\_data/assets/file/0005/55625/57-03\\_049-063.pdf](http://www.pum.edu.pl/_data/assets/file/0005/55625/57-03_049-063.pdf).
- [3] Nair AR, DeGheselle O, Smeets K, Van Kerkhove E, Cuypers A. Cadmium-induced pathologies: Where is the oxidative balance lost (or not)? *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):6116-6143. DOI: 10.3390/ijms14036116.
- [4] Satarug S. Long-term exposure to cadmium in food and cigarette smoke, liver effects and hepatocellular carcinoma. *Curr Drug Metab*. 2012;13:257-271. DOI: 10.2174/138920012799320446.
- [5] Bernhoft RA. Cadmium toxicity and treatment. *Sci World J*. 2013; Article ID 394652, DOI: 10.1155/2013/394652.
- [6] Tellez-Plaza M, Guallar E, Howard BV, Umans JG, Francesconi KA, Goessler W, et al. Cadmium exposure and incident cardiovascular disease. *Epidemiology*. 2013;24(3):421-429. DOI: 10.1097/EDE.0b013e31828b0631.
- [7] Dailiah PR, Padma CL. Cadmium exposure-induced oxidative stress; delay in sexual maturation and impaired hormones in developing rat ovary. *Oxid Antioxid Med Sci*. 2013;2(3):181-187. DOI: 10.5455/oams.1007613.or.048.
- [8] Johri N, Jacquillet G, Unwin R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biomaterials*. 2010;23(5):783-92. DOI: 10.1007/s10534-010-9328-y.
- [9] Nordberg GF. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicol Lett*. 2010;192(1):45-49. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.06.859.

- [10] Moriguchi J, Inoue Y, Kamiyama S, Horiguchi M, Murata K, Sakuragi S, et al. N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) as the most sensitive marker of tubular dysfunction for monitoring residents in non-polluted areas. *Toxicol Lett.* 2009;190(1):1-8. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.05.009.
- [11] Rania A, Kumarb A, Lala A, Panta M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res.* 2014;24(4):378-399. DOI: 10.1080/09603123.2013.835032.
- [12] Luczak MW, Zhitkovich A. Role of direct reactivity with metals in chemoprotection by N-acetylcysteine against chromium(VI), cadmium(II), and cobalt(II). *Free Radic Biol Med.* 2013;65:262-269. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.028.
- [13] Bridges CC, Zalups RK. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;204:274-308. DOI: 10.1016/j.taap.2004.09.007
- [14] Messaoudi I, El Heni J, Hammouda F, Saïd K, Kerkeni A. Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney. *Biol Trace Elem Res.* 2009;130(2):152-161. DOI: 10.1007/s12011-009-8324-y.
- [15] Cullinane J, Bannigan J, Thompson J. Cadmium teratogenesis in the chick: period of vulnerability using the early chick culture method, and prevention by divalent cations. *Reprod Toxicol.* 2009;28(3):335-341. DOI: 10.1016/j.reprotox.2009.05.069.
- [16] Rashidi H, Sottile V. The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. *Bioessays.* 2009;31(4):459-465. DOI: 10.1002/bies.200800168.
- [17] De Oliveira JE. In ovo screening of feed additives show promise. *Feed Mix.* 2009;17(1):9. <http://www.allaboutfeed.net/Home/General/2010/11/In-ovo-screening-of-feed-additives-shows-promise-AAF011537W>.
- [18] Dżugan M, Lis M, Droba M, Niedziółka J.W. Effect of cadmium injected *in ovo* on hatching results and plasma hydrolytic enzymes activity in newly hatched chicks. *Acta Vet Hung.* 2011;59(3):337-347. DOI: 10.1556/A Vet.2011.020.
- [19] Dżugan M, Lis MW, Droba M, Niedziółka JW. Protective effect of zinc on cadmium embryotoxicity and antioxidant status of blood plasma in newly hatched chicks. *J Environ Sci Health, Part A.* 2012;47:1288-1293. DOI: 10.1080/10934529.21012.672133.
- [20] Ulmer-Franco AM, Fasenko GM, O'Dea Christopher EE. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. *Poultry Sci.* 2010;89(12):2735-2742. DOI: 10.3382/ps.2009-00403.

## THE *IN OVO* STUDY OF CADMIUM EMBRYOTOXICITY AND THE SEARCH FOR PROTECTORS

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Food Toxicology, University of Rzeszow

<sup>2</sup> Department of Veterinary and Animal Reproduction and Welfare, University of Agriculture in Krakow

**Abstract:** Cadmium (Cd), an environmental toxin with a high bioaccumulation potential and broad spectrum of activity, poses a real threat to human and animal health. The application of *in ovo* model to cadmium toxicity studies allows to assess the effects of cadmium exposure for developing embryos and creates an ideal scenario for searching effective protectors. The advantage of the model is elimination of environmental influences, nutrition but most of all the availability and low costs of experiment. The study allowed to assess the effects of increasing exposure to cadmium (at a dose of 0-24 µg Cd/egg, injected to egg albumen on 4th day of incubation) for the development of chicken embryos. The mortality and malformations induced by treatment as well as biochemical changes in chicks blood plasma were determined. Based on lysosomal N-acetylglucosaminidase activity it was found that *in ovo* exposure to cadmium lead to damage of chicks liver and kidney. Moreover, it has been shown that co-administration of antagonistic metals or chelating thiols (in a multiplied molar ratio) effectively reduced the embryotoxicity of cadmium in birds.

**Keywords:** cadmium, embryotoxicity, *in ovo* model, protectors