

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim



Kamil Bijowski

**„Wpływ suplementacji cynkiem
na stan oksydacyjno - redukcyjny tkanki kostnej żuchwy
szczurów narażonych na kadm.”**

Rozprawa doktorska
w dziedzinie nauk medycznych

Promotor: Dr hab. n. med. Ewa Dąbrowska

Samodzielna Pracownia Gerostomatologii UMB

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Joanna Rogalska

Zakład Toksykologii UMB

Białystok 2022

*Pragnę złożyć wyrazy wdzięczności Pani Dr hab. n. med. Ewie Dąbrowskiej
za pomoc na każdym etapie przygotowania pracy doktorskiej.*

*Pani Dr n. med. Joannie Rogalskiej
dziękuję za pomoc i cierpliwość podczas wykonywania badań.*

*Panu Dr hab. n. med. Janowi Borysowi
dziękuję za wsparcie i życzliwość.*

Spis treści

I. Wykaz skrótów	5
II. Wstęp.....	8
2.1 Kadm.....	8
2.1.1 Rodzaje i źródła narażenia	8
2.1.2 Metabolizm kadmu w ustroju	9
2.1.3 Mechanizmy działania toksycznego i skutki zdrowotne narażenia.....	11
2.1.4 Wpływ kadmu na układ kostny i zęby	16
2.2 Cynk.....	20
2.2.1 Zapotrzebowanie organizmu na cynk i homeostaza tego biopierwiastka	20
2.2.2 Rola cynku w organizmie człowieka	22
2.2.3 Zatrucie cynkiem	26
2.2.4 Rola cynku w zdrowiu i chorobie jamy ustnej	28
2.3 Źródła wolnych rodników i procesy oksydacyjno-redukcyjne w jamie ustnej.	30
III. Cel i założenia pracy	34
IV. Materiały i metodyka badań	36
4.1 Odczynniki i aparatura.....	36
4.2 Zwierzęta i układ doświadczalny.....	37
4.3 Metodyka badań.....	40
4.3.1 Przygotowanie homogenatów z kości żuchwy.	40
4.3.2 Oznaczanie stężenia cynku i kadmu	42
4.3.3 Antyoksydanty.....	42
4.3.4 Markery stresu oksydacyjnego.....	48
4.4 Analiza statystyczna wyników badań	54
V. Wyniki.....	55
5.1 Stężenie Zn i Cd w tkance kostnej żuchwy	55
5.2 Wpływ Zn na enzymatyczną barierę antyoksydacyjną w tkance kostnej żuchwy szczurów narażanych na kadm.....	58
5.3 Wpływ Zn na oksydacyjne wskaźniki stresu w tkance kostnej żuchwy szczurów narażonych na kadm.	63
5.4 Wpływ Zn na stężenie TOS, TAS oraz stosunek TOS/TAS (OSI) w tkance kostnej żuchwy szczurów narażanych na kadm.	68
5.5 Analiza korelacji Pearsona.....	72
VI. Dyskusja	74

VII. Wnioski	83
VIII. Streszczenie w języku polskim	84
IX. Streszczenie w języku angielskim	86
X. Piśmiennictwo.....	88
XI. Wykaz tabel	105
XII. Wykaz rycin	106
XIII. Zgoda Komisji Etycznej i Kierownika Zakładu, w którym przeprowadzone zostały badania.....	107

I. Wykaz skrótów

4-HHE - 4-hydroksyheksanal

4-HNE - 4-hydroksynonenal

4-HNE z chromogenem - N-metylo-2-fenylindol w acetonitrylu

8-OHdG - 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna

8-OHG - 8-hydroksyguanozyna

AAS - spektrometria atomowo absorpcyjna

Abs – absorbanca

AC - anhydraza węglanowa

ACAN- agrekan

AChE – acetylocholinoesteraza

AP - fosfataza alkaliczna

BMS - zespół pieczenia jamy ustnej

BMSC- mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego

CAL - kalibrator

CAT – katalaza

Cd- kadm

CdMT – kadmotioneina

CdO- tlenek kadmu

COL2A1- kolagen 2A1

CPC - chlorek cetylopirydyniowy

CTRL - próby kontrolne

DAbs/min - zmiana absorbancji na minutę

DAG- diacyloglicerol

DCT1 - transporter metali dwuwartościowych 1

DMT1 - Divalent metal transporter 1

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

DNPH - 2,4-dinitrofenylhydrazyna

ECM- macierz pozakomórkowa

ENZ - roztwór enzymu

EtOH - alkohol etylowy

FAO - Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa

GFR –ang. glomerular filtration rate

GPx - peroksydaza glutationowa
GR – reduktaza glutationowa
GSH – glutation
GSH-Px - Peroksydaza glutationowa
GSSG - dimer glutationu
GSSG - utleniony glutation
GST - transferaza glutationowa
H – wodór
H⁺ - jon wodorowy
H₂ - wodór dwuatomowy
H₂O₂ - Nadtlenek wodoru
HCl- kwas solny
HCO₃⁻ - jon wodorowęglanowy
IARC - Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
IP3- inozytolotrójfosforan
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
K – grupa kontrolna
LPO – peroksydacja lipidów
LR - współczynniki liniowości
MDA - dialdehyd malonowy
MMP - matrix metalloproteinases
MSA - kwas metanosulfonowy
MT – metalotioneina
MTP1- metal transporter protein 1
NADPH - Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADPH - Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NO – tlenek azotu
O₂⁻ - Anionorodnik ponadtlenkowy
OSMF - zwłóknienie podśluzówkowe jamy ustnej
PC - białka karbonylowe
PER - roztworu nadtlenu
RAS - nawracające aftowe zapalenie jamy ustnej
RECSOL - roztwór do rozpuszczania
REFBUF A - bufor reakcyjny A

REFBUF B - bufor reakcyjny B
RFT- reaktywne formy tlenu
RNA – kwas rybonukleinowy
SE - błąd standardowy
-SH - grupa sulfhydrylowa
SOD – dysmutaza ponadtlenkowa
STOP - roztwór stop
TAS - całkowity status przeciwutleniający
TCA - kwas trichlorooctowy
TMB - 1,3,5-trimetylobenzen
TMOP - 1,1,3,3-tetrametoksypropan
TOS - całkowity status oksydacyjny
WHO - World Health Organization
WR- wolne rodniki
Zn – cynk
ZnCl₂ – chlorek cynku
ZnO- tlenek cynku

II. Wstęp

2.1 Kadm

2.1.1 Rodzaje i źródła narażenia

Kadm (Cd) jest metalem ciężkim całkowicie zbędnym dla naszego ustroju. Należy do grupy ksenobiotyków, którym współczesna nauka poświęca wiele uwagi. Wynika to m. in. z powszechności jego występowania, silnych własności kumulacyjnych oraz długiego biologicznego okresu półtrwania w organizmach żywych [8, 27, 28, 49, 106, 108, 150].

W środowisku naturalnym obecny jest w znikomych ilościach. Stwierdza się go na obszarach, gdzie występują rudy cynku, miedzi lub ołowiu, a ich wydobycie zwiększa skażenie środowiska tym pierwiastkiem. Naturalnymi procesami uwalniania kadmu do atmosfery są erupcje wulkanów, wietrzenie skał i pożary lasów. Również działalność człowieka prowadzi do uwalniania znacznych ilości tego metalu do środowiska. Kadm jest, bowiem wykorzystywany do produkcji stabilizatorów polichloru winylu (PCV), farb fluorescencyjnych, nawozów sztucznych (głównie magnezowo-wapniowych i fosforowych), ochrony powłok stalowych przed korozją, produkcji sztucznych ogni, barwienia szkła borokrzemianowego [8, 49]. Tlenek i tellurek kadmu w postaci cienkich warstw znalazły zastosowanie, jako półprzewodniki typu n w fotodiodach, fototranzystorach, fotowoltaicznych ogniwach słonecznych, przezroczystych elektrodach i powłokach antyodbiciowych [5, 49, 106].

Dla populacji generalnej podstawowym źródłem narażenia na kadm jest żywność i woda pitna. Przeciętne pobranie tego metalu z żywnością może wykazywać duże wahania w zależności od rodzaju diety oraz stopnia skażenia artykułów spożywczych [121]. Dlatego też wspólny Komitet Ekspertów FAO/WHO ustalił tolerowane spożycie Cd na poziomie 25 µg na kg masy ciała na miesiąc (0,83 µg/kg masy ciała/dzień lub 58 µg/dzień dla osoby o wadze 70 kg) [121]. W celu ochrony zdrowia ludności przed szkodliwym działaniem tego metalu wyznaczono limity bezpieczeństwa (maksymalne dopuszczalne stężenie) dotyczące zawartości Cd w środowisku (3 mg/kg dla gleb, które są wykorzystywane do produkcji roślin spożywczych oraz 3 µg/L dla wody pitnej) i niektórych środkach spożywczych (0,1 mg/kg dla ziemniaków i 0,4 mg/kg suchej masy ziarna dla ryżu) [25, 121].

75% kadmu człowiek pobiera z żywnością pochodzenia roślinnego, zwłaszcza z warzyw korzeniowych (ziemniaki, marchew, seler, rzodkiew), roślin liściastych (sałata, szpinak), zbóż (pszenica, ryż) oraz nasion (fasola, słonecznik, soja) [121 - 123]. W produktach

pochodzenia zwierzęcego największe ilości tego metalu stwierdza się w podrobach (wątroba, nerki), a nieco mniejsze w tkankach ryb i skorupiaków [81].

Dodatkowym, istotnym, a niekiedy głównym źródłem Cd jest palenie tytoniu. Jeden papieros zawiera 1–2 μg Cd. Przyjmując, że w głównym strumieniu dymu papierosowego znajduje się ok. 10% Cd, a jego retencja w płucach wynosi 40%-50% wypalenie 20 papierosów dziennie spowoduje dodatkowe wchłonięcie do płuc około 2 μg tego pierwiastka [49, 94].

Stwierdzono, że stężenie kadmu w krwi, moczu i tkankach palaczy jest kilkakrotnie większe niż u niepalących [94, 95].

2.1.2 Metabolizm kadmu w ustroju

Wchłanianie Cd odbywa się głównie przez drogi oddechowe oraz w mniejszym stopniu przez przewód pokarmowy, natomiast absorpcja przez skórę jest stosunkowo rzadko spotykana [5, 49].

Wdychanie dymów i pyłów zawierających duże ilości tlenku kadmu (CdO) ma miejsce przede wszystkim w warunkach przemysłowych i u palaczy papierosów. Około 10% wchłoniętego tą drogą Cd kumuluje się w płucach, a pozostała część przenika do krążenia ogólnego [27, 28, 49].

Absorpcja tego pierwiastka z przewodu pokarmowego jest niewielka, wynosi zaledwie 3%-8% i dodatkowo zależy od składników diety oraz stanu odżywienia organizmu [27]. Niska podaż białka i składników mineralnych (cynku, miedzi, wapnia i żelaza) z pokarmem zwiększa wchłanianie kadmu z jelit i jego kumulację w organizmie, natomiast suplementacja diety tymi biopierwiastkami zmniejsza intensywność wchłaniania tego toksycznego metalu [9]. Wynika to z faktu, że zarówno biopierwiastki, jak i kadm są wchłaniane za pomocą tych samych układów transportujących i konkurują między sobą o przenośnik [6, 9].

W żołądku jony kadmu reagują z kwasem solnym tworząc CdCl_2 , który może indukować ostre stany zapalne błony śluzowej przewodu pokarmowego [27].

Proces wchłaniania Cd w jelitach przebiega w dwóch etapach. W pierwszym z nich następuje szybka absorpcja i gromadzenie tego pierwiastka w enterocytach kosmków jelitowych, z czego największa ilość gromadzona jest w dwunastnicy. W kolejnym etapie metal ten jest powoli transportowany do krwiobiegu [27].

W enterocytach, w absorpcji i transporcie kadmu, uczestniczy niespecyficzny przenośnik jonów dwuwartościowych DMT1 (divalent metal transporter) oraz MTP1 (metal transporter protein 1). Metal ten może być również wchłaniany poprzez kanały wapniowe i

system przenośników odpowiedzialnych za transport cynku (hZTL1 i ZNT1) oraz w połączeniu z grupami tiolowymi –SH cysteiny (jako Cd-cysteina) lub glutationu (jako Cd-GSH) [27, 101, 156].

We krwi ok. 60% tego pierwiastka znajduje się w erytrocytach, głównie w postaci związanej z błoną krwinki lub hemoglobina. Pozostała ilość jest transportowana w połączeniu z albuminami, cysteiną i glutationem [27].

Zaabsorbowane jony Cd żyłą wrotną są transportowane do wątroby, gdzie przy udziale DMT1 oraz przez kanały wapniowe wnikają do wnętrza hepatocytów [27, 101]. W komórkach wątrobowych pod wpływem kadmu zachodzi synteza metalotioneiny (MT), niskocząsteczkowego białka (7–8 KDa), zawierającego liczne grupy –SH (18-23 z cysteiny). U ssaków wyróżniamy 4 izoformy tego białka (MT1, MT2, MT3, MT4), a ich grupy –SH mogą kompleksować siedem kationów dwuwartościowych, takich jak Zn^{2+} i Cd^{2+} , lub 12 jonów metali jednowartościowych (Ag^+ , Cu^+) [112, 115, 118].

MT odgrywa niezwykle istotną rolę nie tylko w metabolizmie Cd, ale także cynku i miedzi. Białko to wiążąc jony Zn^{2+} , Cu^{2+} i Cu^+ reguluje ich homeostazę, natomiast wiążąc jony Cd^{2+} zapobiega ich działaniu toksycznemu wewnątrz komórek [9, 28, 112, 118, 156]. Ponadto MT pełni funkcję antyoksydacyjną, unieczynnia bowiem wolne rodniki powstające w stresie oksydacyjnym [115].

Kompleks CdMT (metalotioneina związana z Cd) w niewielkich ilościach jest uwalniany z wątroby do krwi i w tej formie transportowany do nerek, gdzie łatwo ulega filtracji w kłębuszkach, a następnie wchłanianiu zwrotnemu w kanalikach proksymalnych. W komórkach nabłonkowych tych kanalików połączenie CdMT ulega degradacji, a do cytoplazmy uwalniane są jony Cd^{2+} , które kumulują się w korze nerek i uszkodzają ten narząd [9, 27, 101, 115, 156, 157].

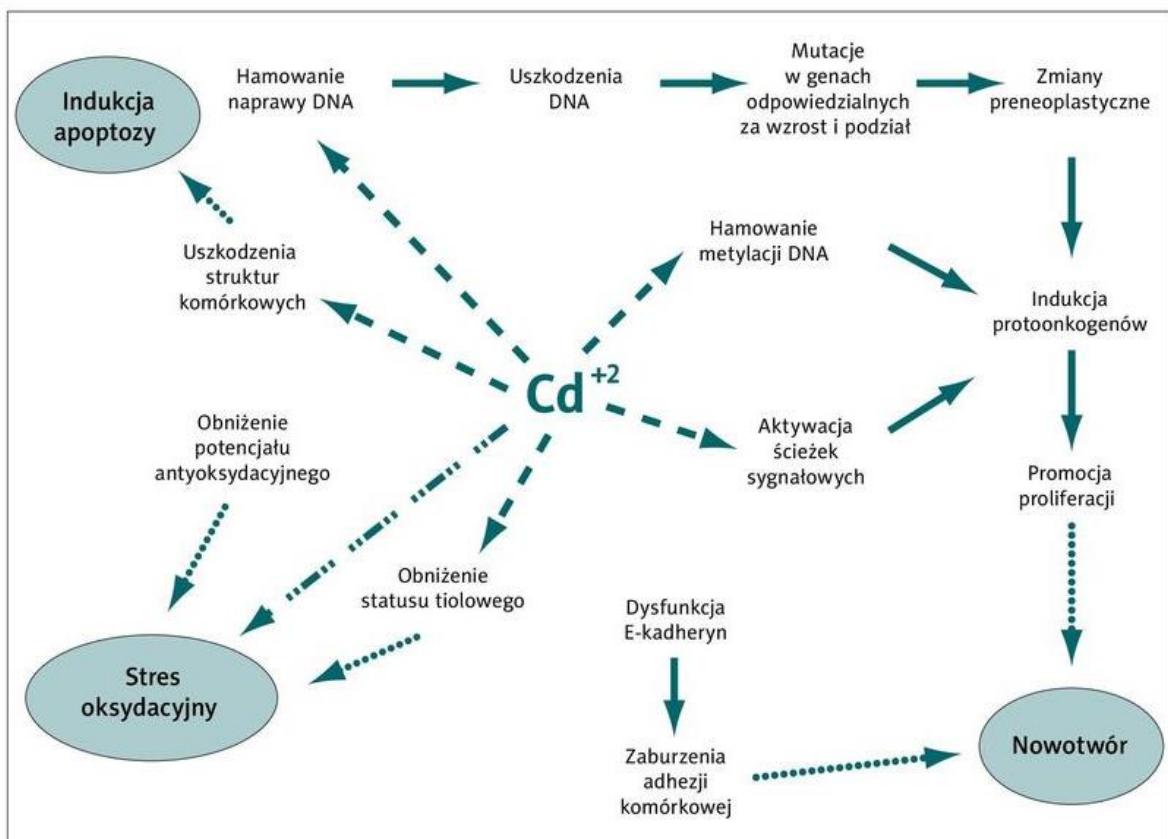
50-75% całkowitej ilości kadmu w organizmie kumuluje się w nerkach i wątrobie, które są narządami tarczowymi dla działania tego metalu [112, 156]. Pierwiastek ten gromadzi się także w płucach, kościach, ośrodkowym układzie nerwowym, jądrach i trzustce [13, 16, 49].

Rozmieszczenie i kumulacja kadmu w organizmie zależy nie tylko od jego postaci chemicznej, ale także od wieku i płci. Połączenia nieorganiczne np. $CdCl_2$ są kumulowane głównie w wątrobie, natomiast kompleks CdMT wykazuje większe powinowactwo do nerek [27]. W badaniach na zwierzętach wykazano, że samice w porównaniu z samcami kumulują więcej kadmu w narządach tarczowych. Także młode osobniki wykazują większą zdolność do wchłaniania kadmu niż dorosłe [27].

Zarówno wolny jak i związany z metalotioneiną kadm jest wydalany z organizmu przede wszystkim przez nerki, a jego stężenie w moczu może odzwierciedlać stopień zatrucia tym metalem. Niewielkie ilości kadmu wydalane są też z kałem, najczęściej w formie sprzężonej z cysteiną, glutationem lub MT [27].

2.1.3 Mechanizmy działania toksycznego i skutki zdrowotne narażenia

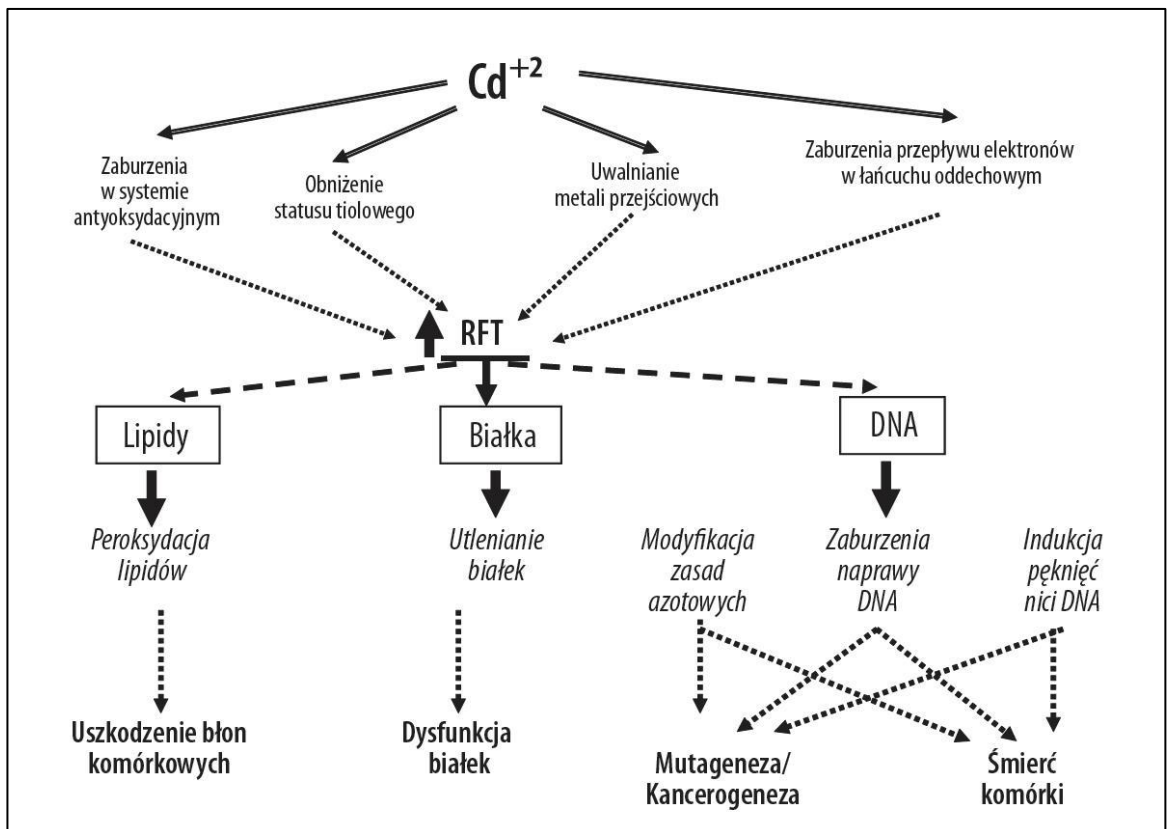
Mechanizm wpływu kadmu na organizmy żywe jest wielokierunkowy (Ryc. 1), a u podstaw dużej toksyczności tego metalu leży oddziaływanie na systemy enzymatyczne komórek polegające na wiązaniu z grupami sulfhydrylowymi (-SH), aminowymi, disiarczkowymi, imidazolowymi i karboksylowymi. Jony Cd^{2+} mogą też wchodzić w interakcje ze wszystkimi organelami komórkowymi, w tym mitochondrium oraz związkami biologicznie czynnymi w cytoplazmie komórki, takimi jak, białka, lipidy i kwasy nukleinowe prowadząc do ich uszkodzenia, a tym samym do zaburzenia funkcjonowania organizmu [27, 28, 49, 106].



Rycina 1. Mechanizmy działania toksycznego kadmu [27].

Metal ten wchodzi również w interakcje z obecnymi w komórkach jonami cynku, miedzi, żelaza, magnezu, wapnia czy selenu, powodując zakłócenie ich homeostazy oraz zaburzenia metabolizmu komórkowego, czego skutkiem są zmiany morfologiczne i funkcjonalne w narządach [27].

Jednym z podstawowych mechanizmów toksycznego działania Cd na komórki wielu tkanek i narządów jest indukcja stresu oksydacyjnego (Ryc. 2). Metal ten nie wykazuje zdolności do bezpośredniej generacji reaktywnych form tlenu (RFT), ale na drodze mechanizmów pośrednich, poprzez hamowanie aktywności przeciwutleniaczy enzymatycznych i nieenzymatycznych oraz uwalnianie metali o wysokiej aktywności redoks, głównie Fe^{2+} i Cu^+ , z miejsc ich występowania (np. białek żelazowo-siarkowych łańcucha oddechowego, ceruloplazminy, ferrytyny) indukuje stan prooksydacyjny w komórkach [8, 27, 49]. Udział Cd w indukcji stresu oksydacyjnego związany jest także z upośledzeniem przepływu elektronów przez kompleks III (cytochrom bc1) mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów [49].



<https://phmd.pl/api/files/viewHtmlImageByName/20100527095156.jpg>

Rycina 2. Udział kadmu w indukcji stresu oksydacyjnego [27].

Niezależnie od rodzaju mechanizmu prooksydacyjnego wpływu kadmu na makrocząsteczki komórkowe dochodzi do wzrostu ilości RFT w komórce, co skutkuje zmianami w strukturze i metabolizmie białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych i prowadzi do uszkodzenia oraz utraty ich funkcji biologicznych. RFT reagując z białkami i wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi błon komórkowych zapoczątkowują proces ich oksydacji, którego efektem są zmiany gradientu błonowego oraz utrata integralności błon komórkowych [27, 28, 49, 55].

Mitochondria są główną strukturą docelową działania kadmu na poziomie subkomórkowym. Jony kadmu wnikają do ich wnętrza przy udziale kanałów wapniowych. Metal ten wiąże się z grupami –SH białek znajdujących się w ich wewnętrznej błonie, co skutkuje zmianami konformacyjnymi tych cząsteczek i wzrostem przepuszczalności błon mitochondrialnych. Dochodzi do zaburzenia potencjału błonowego mitochondrium i równowagi jonowej w komórkach, czemu towarzyszy uwalnianie do cytoplazmy cytochromu c oraz aktywacja kaspaz, kluczowych enzymów apoptozy, aktywujących dalsze proteazy efektorowe. Istnieją dwa różne szlaki apoptotyczne, tj. szlak zewnętrzny, który wyzwała apoptozę w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne (RFT, promieniowanie UV, jonizujące, Ca^{2+} , Cd^{2+}) oraz ścieżka wewnętrzna aktywująca apoptozę w odpowiedzi na bodźce wewnętrzne (uszkodzenie DNA, produkcja RFT przez mitochondria). Jony Cd^{2+} wpływają na oba szlaki apoptozy poprzez aktywację kaspazy-8 (szlak zewnętrzny) i kaspazy-9 (szlak wewnętrzny), które z kolei aktywują kaspazę-3 i kaspazę-7 prowadząc do apoptotycznej fragmentacji DNA [49]. Do indukcji apoptozy przez kadm może też dochodzić na drodze niezależnej od kaspaz. Stwierdzono, że jony Cd^{2+} mobilizując jony Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego, aktywują kalpainy, prowadząc ostatecznie do fragmentacji DNA [49].

Dodatkowo kadm może oddziaływać niekorzystnie na komórkowe szlaki sygnalizacyjne na każdym etapie transdukcji sygnału, od receptora poprzez drugie przekaźniki w komórce (np. inozytolotrójfosforan (IP3) i diacyloglicerol (DAG)) do czynników transkrypcyjnych (np. NF- κ B, NRF2) [102].

Cd i jego związki są klasyfikowane według IARC (Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem) jako czynniki rakotwórcze od 1993 roku [60]. Badania wskazują na związek między ekspozycją na Cd, a ryzykiem rozwoju nowotworów u ludzi, takich jak rak piersi, prostaty, nerki, płuc, jamy nosowo-gardłowej, trzustki, pęcherza moczowego i żołądka [21, 53, 63, 92, 172, 173].

Poznany jest też mechanizm kancerogennego działania kadmu. Obejmuje on przede wszystkim zmiany strukturalne w łańcuchu DNA (nieprawidłowa metylacja), dysfunkcję

enzymów naprawczych DNA (8-okso-DNA-glikozydazy i endonukleazy III), inhibicję przyłączania białek do miejsc uszkodzeń DNA (np. białka XPA), indukcję stresu oksydacyjnego oraz utratę integralności tkanek (zmiana konformacji E-kadheryn i zaburzenia w przekazywaniu sygnału przez β -kateniny) [8, 27, 28, 49, 172]. Na skutek tych zmian dochodzi do aktywacji protoonkogenów, wzmożonej proliferacji komórek i rozwoju nowotworów [27, 28, 49, 172].

W zależności od czasu ekspozycji, drogi wchłaniania i wielkości przyjętej dawki zatrucia kadmem mogą przebiegać w postaci ostrej lub przewlekłej.

Głównymi objawami zatruc ostrych u ludzi są zapalenie płuc w wyniku ekspozycji inhalacyjnej oraz zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego w wyniku spożycia produktów zanieczyszczonych związkami kadmu [108].

Zatrucia drogą wziewną występują w warunkach przemysłowych. Są szczególnie niebezpieczne, gdyż po początkowych objawach rozpoznawanych jako „gorączka odlewników” (kaszel, duszność, krótki oddech, gorączka i dreszcze) może wystąpić obrzęk płuc prowadzący do niewydolności oddechowej i zgonu, co zostało potwierdzone u 78 letniego, wcześniej zdrowego mężczyzny, który był narażony na opary kadmu podczas lutowania i zmarł w ciągu 25 dni od ekspozycji [108]. Jednak zatrucia takie są bardzo rzadkie.

Zdecydowanie częściej dochodzi do zatrucia spowodowanego długotrwałym oddziaływaniem kadmu na organizm, a skutki zdrowotne chronicznego narażenia ludzi to przede wszystkim dysfunkcja nerek, wątroby, kości, płuc, mózgu, jąder i układu krwiotwórczego [11, 12, 49, 76, 82, 92, 95, 108, 109, 150, 156, 174].

Nerki są organem krytycznym w przypadku przewlekłego zatrucia kadmem i głównym miejscem jego kumulacji oraz detoksykacji w organizmie. Kumulacja Cd w nerkach prowadzi do zmniejszenia wskaźnika filtracji kłębuszkowej (GFR –ang. glomerular filtration rate), wielomoczu i uogólnionej dysfunkcji kanalików proksymalnych. Jako markery wczesnych skutków działania Cd na czynność nerek wykorzystuje się oznaczenia białka Kim-1 (transbłonowa glikoproteina typu pierwszego), β 2-mikroglobuliny, N-acetylo- β -D-glukozamidazy (NAG) i cystatyny C w moczu [101, 105].

Wykazano, że nawet niska ekspozycja na ten toksyczny metal może skutkować dysfunkcją nerek, a najwcześniejszym objawem zmian czynnościowych w tym narządzie jest mikroproteinuria, która zwykle charakteryzuje się obecnością β 2-mikroglobuliny w moczu [34, 83, 101, 149]. Ponadto zmniejszona zdolność wchłaniania przez komórki kanalików proksymalnych może prowadzić do wystąpienia zespołu Fanconiego charakteryzującego się glukozurią, aminoacydurią, hiperfosfaturią i hiperkalciurią [101].

U osób przewlekle narażonych na Cd, wzrasta również częstość występowania kamieni nerkowych prawdopodobnie z powodu zaburzenia gospodarki wapniowej (zwiększonego stężenia wapnia w płynie cewkowym i moczu) oraz metabolizmu witaminy D w nerkach [62].

Chroniczne wdychanie aerozoli zawierających cząsteczki kadmu, które ma miejsce głównie w warunkach zawodowych, może skutkować podrażnieniem dróg oddechowych, zapaleniem tkanki płucnej, obturacyjną chorobą płuc, rozedmą oraz nowotworami płuc [49].

W wyniku inhalacji nanocząstek CdO zaobserwowano zmiany ultrastrukturalne w płucach, w tym przekrwienie naczyń włosowatych i niewielki obszary niedodmy, a nanocząsteczki CdO wykryto w cytoplazmie oskrzelików, a także w przestrzeniach pęcherzykowych [49].

Chroniczna ekspozycja na kadm przyczynia się również do wystąpienia chorób układu krążenia wliczając miażdżycę. Spowodowane jest to uszkodzeniem struktury śródbłonna i komórek mięśni gładkich naczyń [30, 46]. Udokumentowano także bezpośrednie kardi toksyczne działanie tego metalu polegające na obniżeniu kurczliwości mięśnia sercowego, co skutkuje zmniejszeniem pojemności minutowej i wyrzutowej [106].

Kadm wpływa też negatywnie na układ rozrodczy. U mężczyzn prowadzi do dysfunkcji jąder oraz upośledzenia czynności hormonalnych i wydzielniczych gruczołu krokowego, co skutkuje zaburzeniem spermatogenezy (obniżenie jakości nasienia), a w konsekwencji prowadzi do bezpłodności [76, 106]. U kobiet zaś może wpływać negatywnie na funkcje jajników i hamować rozwój oocytów. Ponadto metal ten może niszczyć strukturę morfologiczną łożyska, przenikać do zarodka i przyczyniać się do powstawania wad rozwojowych płodu, a także wyższego odsetka poronień samoistnych [50, 106].

Długotrwała ekspozycja na kadm skutkuje również zaburzeniami w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Obejmują one między innymi zmiany w syntezie i/lub metabolizmie amin biogennych i aminokwasów neuroprzekaźnikowych oraz jonów Ca^{2+} , jak również inhibicję aktywności acetylocholinoesterazy, monoaminooksydazy oraz fosfatazy kwaśnej i zasadowej [77, 106]. U ludzi ekspozycja na kadm wiąże się z zaburzeniami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Parkinsona, Alzheimerera i Huntingtona, którym towarzyszy utrata pamięci i zmiany behawioralne [77, 106].

Kadm upośledza również wzrok i słuch [92, 153]. U osób chorujących na zwyrodnienie plamki żółtej stwierdzono podwyższone stężenie tego pierwiastka [153].

Długotrwałe narażenie na kadm wpływa też negatywnie na jamę ustną, gdzie obserwuje się suchość, metaliczny posmak, powstawanie żółtych rąbków u nasady zębów czyli tzw.

pierścieni kadmowych, które powiększają się współmiernie do czasu ekspozycji na ten pierwiastek i mają tendencję do samoistnego ustępowania po ustaniu narażenia [28].

Przy postępującym zanieczyszczeniu środowiska kadmem najbardziej niepokojące wydają się być efekty odległe działania tego toksycznego metalu takie, jak genotoksyczne, kancerogenne i teratogenne [5, 8, 27, 49, 60].

2.1.4 Wpływ kadmu na układ kostny i zęby

Negatywny wpływ Cd na układ kostny jest jednym z głównych efektów zarówno środowiskowego, jak i zawodowego narażenia na ten ksenobiotyku [19, 79, 95].

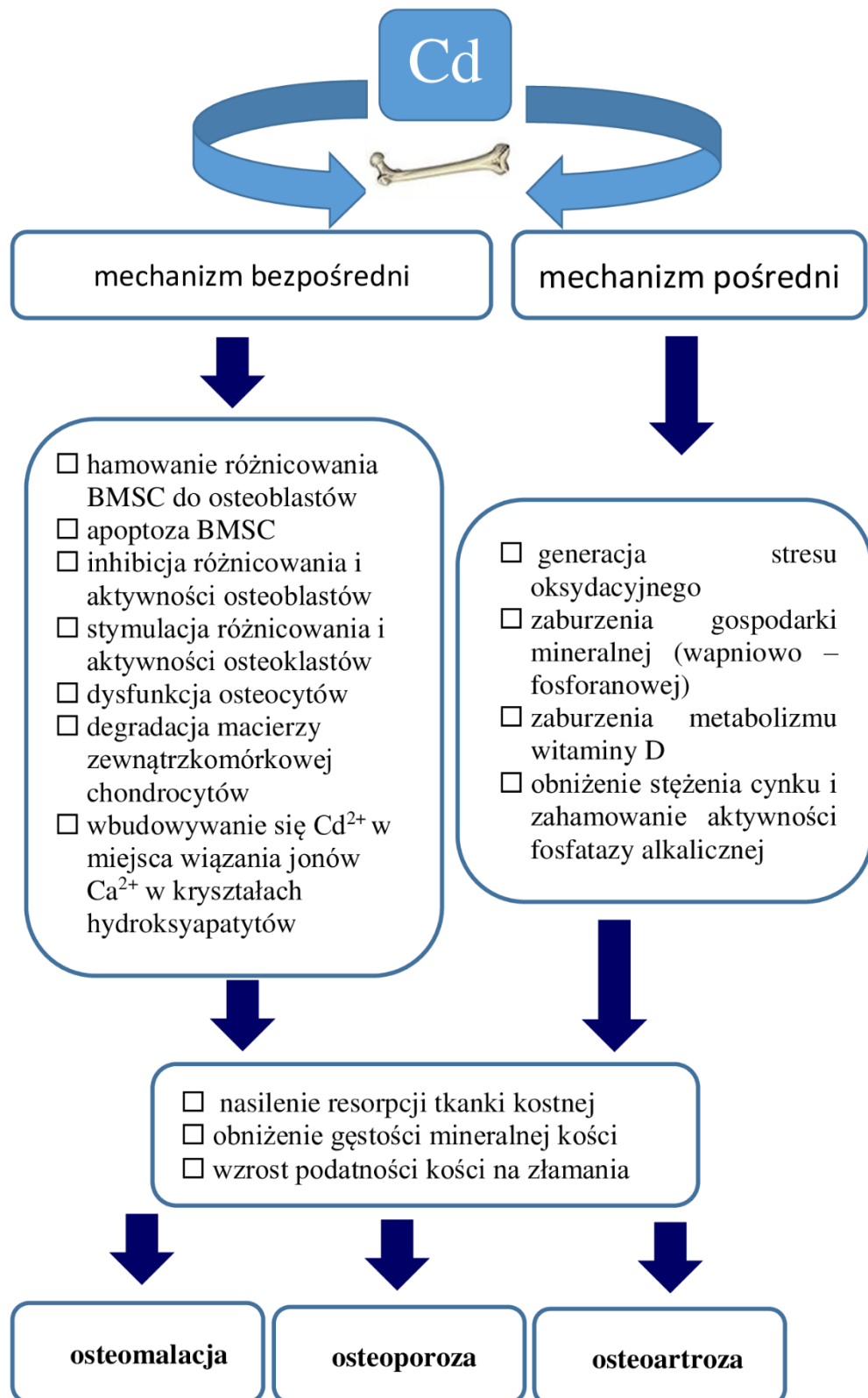
W badaniach epidemiologicznych z ostatnich lat wykazano, iż nawet niska ekspozycja na ten toksyczny metal, która aktualnie ma miejsce w krajach wysoko uprzemysłowionych, jest istotnym czynnikiem ryzyka uszkodzenia kości [19, 20, 34, 147, 148].

Potwierdzeniem negatywnego oddziaływania kadmu na układ szkieletowy jest choroba Itai-Itai. Pierwszym udokumentowanym przypadkiem tej choroby było masowe zatrucie kadmem w prowincji Toyama w Japonii, w 1964 roku. Wysokie narażenie miejscowej ludności na kadm było związane ze spożywaniem ryżu uprawianego na polach, nawadnianych zanieczyszczoną kadmem wodą z rzeki. Chorowały głównie kobiety, wieloródki, a cechą charakterystyczną choroby była demineralizacja kości, połączona z dysfunkcją kanalików nerkowych. U chorych występowała też osteoporoza, której towarzyszyły silne bóle kości, mięśni oraz stawów, głównie kręgosłupa i kończyn dolnych [61].

Mechanizmy wpływu kadmu na kości wciąż nie są do końca jasne, ale sugeruje się zarówno pośrednie, jak i bezpośrednie działanie tego metalu na tkankę kostną (Ryc. 3) [82, 147, 148].

Za mechanizm pierwotny uważa się bezpośredni wpływ Cd na komórki kostne, w tym na procesy ich różnicowania i aktywność metaboliczną [82, 148].

Aktywność metaboliczna tkanki kostnej związana jest z procesem przebudowy kości i zależy od aktywności komórek kostnych, tj. osteoblastów, osteoklastów i osteocytów [82]. Osteoblasty są komórkami budującymi kość, natomiast osteoklasty odpowiadają za jej destrukcję, osteocyty zaś stanowią 90-95% wszystkich komórek kostnych i odgrywają istotną rolę w regulacji funkcji osteoklastów i osteoblastów [26, 137].



Rycina 3. Mechanizmy wpływu kadmu na kości - opracowanie własne na podstawie [20, 26, 82, 137, 147, 148].

Cd wpływa na funkcję mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (BMSC), które odgrywają zasadniczą rolę w utrzymaniu prawidłowej liczby osteoblastów oraz regulują metabolizm i przebudowę tkanki kostnej [90]. Traktowanie BMSC Cd (15–45 μM) przez 24–48 godzin znacznie zmniejszyło żywotność tych komórek w sposób zależny od dawki i czasu narażenia oraz prowadziło do zmian morfologicznych, uszkodzenia DNA i wzrostu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} [59]. Mehranjani i Mosavi [90] stwierdzili, że 21 dniowa ekspozycja na Cd (0,75–2 μM) znacznie obniżała żywotność komórek BMSC i poziom mineralizacji macierzy kostnej. Zmniejszenie żywotności BMSC może wpływać na tworzenie osteoblastów, co dodatkowo hamuje tworzenie kości. Także Rodríguez i Mandalunis [110] stwierdzili, że Cd hamuje różnicowanie BMSC w osteoblasty, ale zwiększa ich różnicowanie w adipocyty.

Ponadto Cd hamując różnicowanie BMSC do osteoblastów bezpośrednio prowadzi do ich apoptozy m.in. poprzez aktywację kaspazy-3 [82, 171]. Apoptoza odgrywa kluczową rolę w dysfunkcji osteoblastów wywołanej przez Cd, ponieważ jest ważnym elementem przebudowy kości, a przebiegając nieprawidłowo może przyczyniać się do utraty masy kostnej, powodując osteoporozę. Ponadto stres oksydacyjny może odgrywać kluczową rolę w indukowanej przez Cd śmierci osteoblastów, niszcząc strukturę błony mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego [82]. Ekspozycja na kadm komórek MG-63 (podobnych do ludzkich osteoblastów) w stężeniu 20 i 50 μM Cd przez 24 i 48 godzin prowadziła do zależnego od dawki wzrostu kumulacji tego metalu w komórkach i obniżenia ich żywotności, zwłaszcza po 48 godzinach. Obie dawki Cd indukowały wzrost występowania mikrojąder, mostków nukleoplazmatycznych i fragmentację DNA, co potwierdza cytotoksyczność i genotoksyczność Cd w ludzkich komórkach kostnych [100].

Cd wpływa też na aktywację osteoklastów i sprzyja resorpcji kości. Wykazano, że długotrwałe narażenie na ten metal skutkuje utratą masy kostnej, osteopenią i osteoporozą, zwiększając nawet częstość złamań. Ponadto Cd zwiększa zdolność osteoklastów do resorpcji kości poprzez regulację produkcji prostaglandyny PGE_2 , która została uznana za silny czynnik resorpcyjny [57, 82].

W innych badaniach wykazano, że Cd wpływa na morfologię i funkcję osteocytów oraz aktywuje metaloproteinazy (MMP) związane z degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP1, MMP3, MMP9 i MMP13) chrząstki stawowej w chondrocytach, wpływając na ekspresję agrekanu (ACAN) i kolagenu 2A1 (COL2A1) oraz stężenie glikozaminoglikanów i proteoglikanów poprzez reakcję zapalną (aktywacja $\text{IL-1}\beta$ i IL-6) i stres oksydacyjny (tworzenie O_2^{\bullet} i H_2O_2) [144, 159].

Pośredni wpływ Cd na kości związany jest głównie z niedoborem składników mineralnych, w tym wapnia i cynku, na skutek zmniejszonej absorpcji tych metali z przewodu pokarmowego i zwiększonej eliminacji z moczem w wyniku dysfunkcji nerek. Możliwym mechanizmem pośrednim jest też zmniejszone wytwarzanie aktywnej witaminy D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) w nerkach, co skutkuje zmniejszonym wychwytem wapnia i fosforu z jelit [148].

Ponadto Cd zmniejsza ekspresję markerów różnicowania osteoblastów (Runx2, osteokalcyna), białek zewnątrzkomórkowej macierzy kostnej (kolagen typu I) oraz hamuje aktywność enzymów biorących udział w procesie mineralizacji (alkalicznych fosfataz) [38, 109].

Zęby są najtwardszym organem w organizmie i składają się ze szkliwa, zębiny i miazgi zębowej, a toksyczność Cd w stosunku do zębów koncentruje się głównie na rozwoju szkliwa i próchnicy zębów [82, 139]. Jak wykazała Świetlicka i wsp. [139] znaczący wzrost poziomu kadmu w zębach dorosłych szczurów narażonych na kadm (4 mg Cd/kg mc przez 10 tygodni) skutkowało zmniejszeniem zawartości hydroksyapatytu, zmianą w kolorze zębów, zmniejszeniem długości i wzrostem twardości pigmentowanego szkliwa oraz większą nieregularnością jego powierzchni w porównaniu do kontroli.

Natomiast znaczna kumulacja Cd w kości wyrostka zębodołowego wykazana w badaniach Browar i wsp. [12] sugeruje bezpośrednie działanie osteotoksyczne tego metalu.

Ponadto badania prowadzone przez Malara i wsp. [84] oraz Wychowańskiego i Małkiewicza [154] potwierdzają, że twarde tkanki zębów mogą stanowić cenny materiał do oceny długotrwałego narażenia środowiskowego na jony kadmu.

Analiza porównawcza danych wykazała, że szkliwo i zębina mieszkańców terenów uprzemysłowionych zawierają istotnie większe ilości kadmu niż twarde tkanki zębów mieszkańców terenów rolniczych [154].

W innych badaniach określono stężenie kadmu w zębach trzonowych i kościach otaczających zęby. Próbkę pochodziły od ludzi mieszkających na dwóch obszarach o różnym stężeniu metali ciężkich w środowisku. Stężenie kadmu w badanym materiale było istotnie wyższe u osób zamieszkujących tereny silnie zanieczyszczone (Ruda Śląska) niż u osób mieszkających w rejonie mniej zanieczyszczonym (Bielsko-Biała) [84].

Wyniki wskazują, że zęby żuchwy i otaczające je kości mogą odzwierciedlać narażenie ludzi na kadm obecny w środowisku.

2.2 Cynk

Cynk (Zn) jest jednym z mikroelementów niezbędnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju wszystkich tkanek i narządów organizmu ludzkiego [47, 129 – 131, 152]. Odgrywa kluczową rolę w wielu procesach komórkowych, przez co wpływa na metabolizm ogólnoustrojowy [22, 47, 129, 130].

W przyrodzie pierwiastek ten nie występuje w formie metalicznej, a tylko w związkach chemicznych (minerałach – sfaleryt, smitsonit) na +2 stopniu utlenienia. Jest metalem o właściwościach amfoterycznych, nie reaguje bezpośrednio z wodą, natomiast reaguje z kwasami, zwłaszcza beztlenowymi i zasadami [103].

Cynk metaliczny jest stosowany do produkcji stopów odlewniczych z aluminium (zinal) oraz miedzią (mosiądz i tombak). Tlenek cynku (ZnO) wykorzystuje się m.in. w kosmetyce (jako pigment i stabilizator promieni UV), w stomatologii (do tymczasowych wypełnień), w dermatologii (jako składnik maści i zasypek leczących różne choroby skórne), a także jako wypełniacz i stabilizator gum, kauczuku i tworzyw sztucznych oraz w środkach do impregnacji drewna. Szerokie zastosowanie ma także chlorek cynku, m.in. w stomatologii do produkcji cementów magnezytowych, w płynach antyseptycznych do płukania jamy ustnej, w środkach ściągających, do produkcji pergaminu i jedwabiu sztucznego czy do produkcji bomb dymnych. Inny związek tego metalu – ortofosforan cynku wykorzystuje się jako cement dentystyczny do cementowania koron, mostów i aparatów ortodontycznych oraz jako podstawę do uzupełnień protetycznych i wypełnień tymczasowych. W medycynie zastosowanie znalazł też siarczan (VI) cynku jako środek ściągający i wymiotny oraz wodorotlenek cynku jako adsorbent w opatrunkach medycznych [103].

2.2.1 Zapotrzebowanie organizmu na cynk i homeostaza tego biopierwiastka

Podstawowym źródłem Zn dla populacji generalnej jest dieta. Najlepszym źródłem tego biopierwiastka są produkty mięsne i drobiowe w tym jagnięcina, wołowina, królik, kurczak oraz owoce morza, szczególnie ostrygi i homary [41]. Ponadto produkty pełnoziarniste takie jak ryż, sezam, chleb i makaron oraz seler, rośliny strączkowe (fasola, groch i soczewica), produkty sojowe, grzyby, orzechy i nasiona słonecznika oraz migdały są również dobrym źródłem cynku [129].

Ogólnie biodostępność cynku z pokarmów pochodzenia zwierzęcego jest wyższa niż z pokarmów roślinnych. Zawarte w produktach roślinnych fityniany, lignina i błonnik utrudniają

jego przyswajalność. Stosunek molowy fitynian:cynk większy niż 15:1 znacznie obniża wchłanianie cynku [56].

Natomiast diety rafinowane o niskiej zawartości błonnika zbożowego i kwasu fitynowego oraz odpowiednia zawartość białka, głównie ze źródeł nieroślinnych, takich jak mięso i ryby, zwiększają biodostępność tego mikroelementu [56, 127].

Zalecane dzienne spożycie cynku waha się od 1,5 mg/24h u niemowląt do 13 mg/24h u ciężarnych i karmiących kobiet [129].

Biorąc pod uwagę biodostępność cynku, a zwłaszcza zawartość fitynianów w spożywanych produktach, Haasea i wsp. [56] opracowali wartości referencyjne dla spożycia tego biopierwiastka na poziomie 11-16 mg Zn/24h dla mężczyzn oraz 7-10 mg Zn/24h dla kobiet. Wyższe spożycie Zn jest rekomendowane dla kobiet ciężarnych (1 trymestr 7-11 mg Zn/24h; 2 i 3 trymestr 9-13 mg Zn/24h) oraz karmiących (11-14 mg Zn/24h). Zgodnie z przyjętymi przez Haasea i wsp. [56] kryteriami, dzieci w wieku od 0 do roku powinny spożywać od 1,5 do 2,5 mg Zn/24h.

Zn znajduje się we wszystkich tkankach i płynach ustrojowych, a jego całkowita zawartość w organizmie szacowana jest na 2-3g. Mężczyźni zazwyczaj mają nieco wyższą zawartość cynku w organizmie (2,5 g) w porównaniu do kobiet (1,5 g). Biopierwiastek ten jest rozmieszczony nierównomiernie w różnych narządach i tkankach. Prostata, trzustka, mięśnie i kości są znacznie bogatsze w cynk (zawierają do 200 µg Zn/g) niż serce, mózg i osocze, gdzie stężenia Zn są stosunkowo niskie, na poziomie 1-23 µg/g. Chociaż we krwi krąży tylko 1 µgZn/g, to jest to prawdopodobnie najważniejszy organ uczestniczący w utrzymaniu homeostazy tego biopierwiastka [56, 129, 152]. Ponieważ Zn nie ulega kumulacji, wymagane jest regularne dostarczanie organizmowi tego elementu, aby zapobiec jego niedoborom, a co za tym idzie wielu dolegliwościom i schorzeniom [56, 129 – 131, 152].

25–66% cynku przyjmowanego doustnie wchłania się w jelicie cienkim, a szczególnie w dwunastnicy. Transport Zn w głąb enterocyta zachodzi przy pomocy transportera metali dwuwartościowych 1 (DCT1), który jest zlokalizowany w rąbku szczoteczkowym [163]. DCT1 transportuje również inne metale, jak miedź, żelazo, kadm, mangan, nikiel, kobalt i ołów.

Subkomórkowo cynk jest rozmieszczony głównie w specyficznych pęcherzykach magazynujących zwanych cynkosomami (ok. 50%) i jądrze (30-40%), a pozostała część w cytoplazmie w retikulum endoplazmatycznym lub aparacie Golgiego [152]. W cytoplazmie Zn jest w dużej mierze wiązany przez białka chelatujące zwane metalotioneinami, które odgrywają ważną rolę w homeostazie tego pierwiastka poprzez kompleksowanie około 20% wewnątrzkomórkowego cynku. Dystrybucja cynku między cytozolem, a organellami odbywa

się za pośrednictwem swoistych białek transportujących z rodziny Zip (14) oraz ZNT (10) [22, 64, 163]. Białka ZIP znajdują się w błonach komórkowych i są głównie odpowiedzialne za transport Zn^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub organelli do cytoplazmy. Ich ilość jest regulowana stężeniem Zn^{2+} . Gdy stężenie Zn^{2+} wzrasta, ZIP są usuwane z powierzchni komórki na drodze endocytozy, chroniąc je przed nadmiarem tego elementu. Natomiast większość białek ZNT znajduje się w błonie komórek nabłonka jelitowego i jest odpowiedzialna za przenoszenie cytoplazmatycznego Zn^{2+} do przestrzeni pozakomórkowej [64, 163].

Homeostaza cynku jest zatem kontrolowana przez 24 białka transportujące cynk i cztery MT (MT1-4), które odgrywają znaczącą rolę w dystrybucji, transporcie i utrzymaniu wewnątrzkomórkowego poziomu cynku [143, 163].

We krwi cynk wiąże się z białkami, głównie albuminami (57%), α 2-makroglobuliną (40%), transferyną i aminokwasami (3%), które odpowiadają za jego dystrybucję w organizmie. Albumina wiąże cynk ze stosunkowo niskim powinowactwem, α 2-makroglobulina ze średnim, a transferyna z wysokim [152].

Eliminacja cynku z organizmu następuje głównie przez przewód pokarmowy (aż 50% całego wydalonego metalu). Ważną rolę w wydalaniu tego biopierwiastka odgrywa trzustka, której komórki groniaste są bogate w cząsteczki proenzymu wymagającego do prawidłowego funkcjonowania jonów Zn^{2+} . ZNT2 jest rozmieszczony w cząsteczkach tego proenzymu i bierze udział w jego transporcie w komórkach groniastych poprzez szlak regulacyjny MTF-1, kontrolując wydalanie Zn^{2+} z trzustki [54]. Jest to ważny proces w regulacji równowagi tego biopierwiastka w organizmie. Innymi fizjologicznymi szlakami utraty Zn^{2+} z ustroju są pot, mocznik i nasienie [68].

2.2.2 Rola cynku w organizmie człowieka

Biologiczna rola cynku związana jest głównie z wpływem tego metalu na skład enzymów i białek regulatorowych (czynników transkrypcyjnych) [143].

Metal ten jest kofaktorem ok. 300 metaloenzymów, w tym anhidrazy węglanowej, fosfatazy alkalicznej, dehydrogenazy alkoholowej, dysmutazy ponadtlenkowej, polimerazy DNA, polimerazy RNA I i II, karboksypeptydazy A, B, C oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej [143].

MMP należą do enzymów proteolitycznych, które bezpośrednio regulują procesy zachodzące w macierzy pozakomórkowej (ECM), w tym degradację białek (kolagen, laminina, proteoglikany, fibronektyna). W warunkach fizjologicznych te metaloenzymy są

odpowiedzialne za embriogenezę, angiogenezę i gojenie się ran, a także uczestniczą w wielu procesach immunologicznych [22]. Zhang i wsp. [168] zaobserwowali, że w śledzionie myszy z niedoborem Zn^{2+} , ekspresja MMP-2, MMP-9 i MMP-13 była niższa niż u zwierząt kontrolnych, co nasilało włóknienie tego narządu.

Cynk jako kofaktor fosfatazy alkalicznej (AP) bierze udział w procesie mineralizacji kości. W badaniach wykazano, że wysoka aktywność AP przekłada się na zwiększoną aktywność osteoblastów, natomiast niska aktywność prowadzi do upośledzenia mineralizacji kości, hiperkalcemii i przedwczesnej utraty zębów [91, 99]. Ponadto udokumentowano, że cynk wpływa na proliferację i różnicowanie osteoblastów i osteoklastów poprzez komórkowy szlak RANK/RANKL/OPG [15, 39, 91].

Natomiast obecność Zn w anhidryzie węglanowej (AC) pozwala na prawidłowe utrzymanie gospodarki kwasowo - zasadowej organizmu, zarówno w płucach, podczas wydalania CO_2 , jak i w kanalikach nerkowych, warunkując odtwarzanie jonu wodorowęglanowego (HCO_3^-) i wydalanie jonu wodorowego (H^+) [47]. Ponadto AC jest ważnym czynnikiem w utrzymaniu smaku. Wysoką aktywność AC stwierdzono w brodawkach języka związanych z kubkami smakowymi [22].

Ważną rolą cynku w organizmie jest jego udział w procesach antyoksydacyjnych. Metal ten pełni funkcję antyoksydacyjną na wiele sposobów [22, 131]. Cynk ma silne działanie przeciwutleniające, głównie jako składnik dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), która katalizując dysmutację anionorodników ponadtlenkowych do nadtlenku wodoru, zapobiega powstawaniu innych toksycznych wolnych rodników i ich pochodnych, np. hydroksylovych czy peroksyazotynowych zarówno w cytoplazmie, jak i macierzy zewnątrzkomórkowej [22, 131]. Inny mechanizm antyoksydacyjnego działania cynku polega na jego antagonizmie o miejsca wiązania w białkach, lipidach czy DNA z jonami metali przejściowych tj. żelazem lub miedzią, które uczestniczą w powstawaniu wolnych rodników (np. w reakcji Fentona lub Habbera-Weissa). Jony Zn^{2+} zajmując miejsca ich wiązania przeciwdziałają tym reakcjom [22, 131]. Cynk uczestniczy również w ochronie grup sulfhydrylovych białek przed utlenianiem poprzez tworzenie chelatów hamujących zmiany przestrzenne ich struktury. Jednym z przykładów jest białko Keap1. Białko to ma na swojej powierzchni liczne reszty cysteiny, które mogą ulec utlenieniu, a w wyniku tej reakcji zmienia się jego struktura, uwalniają Zn^{2+} i czynnik transkrypcyjny Nrf2, który w warunkach fizjologicznych występuje w cytoplazmie w postaci związanej z białkiem Keap1 cytoszkieletu [88]. Dodatkowo wzrost stężenia wolnego cynku w wyniku rozpadu chelatów białkowych może działać jako czynnik prewencyjny, regulujący odpowiedź na stres oksydacyjny za pomocą Nrf2, którego rolą jest ochrona komórek przed

szkodliwymi skutkami stresu. W warunkach nadmiaru RFT Nrf2 ulega dysocjacji od nieaktywnego kompleksu z Keap1, przemieszcza się do jądra i wiąże z cząsteczką DNA. Prowadzi to do transkrypcji genów kodujących białka antyoksydacyjne o małej masie cząsteczkowej (np. tioredoksyna, ferrytyna, metalotioneiny), które są odpowiedzialne za ochronę komórki przed reaktywnymi formami tlenu. Zarówno wspomniane zmiany konformacyjne w białku Keap1, jak i fosforylacja Nrf2 może leżeć u podstaw dysocjacji kompleksu Nrf2–Keap1. Białko Keap1 działa jako „czujnik” stresu oksydacyjnego i jest cząsteczką pośrednio odpowiedzialną za regulację ekspresji genów zależnych od Nrf2 [88].

Cynk jest również składnikiem metalotionein, które wykazują zdolność do zmiatania rodników hydroksylowych i jest ona 300 razy większa niż zdolność antyoksydacyjna glutationu. MT są to białka drobnocząsteczkowe, bogate w reszty tiolowo-cysteinowe (20 z 61 aminokwasów to cysteina), działające jako zmiatacze wolnych rodników w skórze, wątrobie i komórkach szpiku kostnego [114]. MT są ważnymi regulatorami poziomu cynku w komórkach. Cynk i miedź są fizjologicznymi induktorami MT, chociaż białka te wiążą się również z innymi jonami dwuwartościowymi. Pojedyncza cząsteczka MT jest zdolna do wiązania siedmiu jonów Zn^{2+} i 12 jonów jednowartościowych Cu^{+} [9, 112].

MT zidentyfikowano zarówno w środowisku zewnątrzkomórkowym, jak i wewnątrzkomórkowym. Ich wewnątrzkomórkowa pula odpowiada za detoksykację metali ciężkich, w tym kadmu oraz reaktywnych form tlenu i azotu. Natomiast zewnątrzkomórkowe MT działają jako przeciwutleniacze, transportują metale między tkankami i biorą udział w odpowiedzi komórkowej na stres. Wyróżniamy 4 izoformy MT, tj MT-1, MT-2, MT-3 i MT-4. MT-1 i MT-2 ulegają ekspresji w różnych tkankach, podczas gdy MT-3 tylko w mózgu, a MT-4 jest ograniczona do nabłonka wielowarstwowego płaskiego skóry i górnych części przewodu pokarmowego [131, 152]. Izoformy MT-1 i MT-2 uczestniczą w metabolizmie Zn, przyczyniając się do zachowania jego homeostazy poprzez dystrybucję i uwalnianie [114]. Ponadto białka te chronią strukturę DNA przed uszkodzeniem, a chroniczny niedobór cynku zwiększa podatność na uszkodzenia wywołane przez RFT [58].

Homeostaza cynku jest niezbędna także dla wielu aspektów prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego, w tym hematopoezy, dojrzewania i różnicowania komórek oraz progresji cyklu komórkowego. Zarówno niedobór, jak i nadmiar tego mikroelementu upośledza czynność tego układu. Zn pomaga w utrzymaniu prawidłowej liczby limfocytów, w tym regulatorowych, pomocniczych i cytotoksycznych limfocytów T, które pełnią funkcję ochronną przed infekcją [152]. Może też odwracalnie hamować fosfodiesterazę błonową i zmniejszać ekspresję mRNA dla tego enzymu, co z kolei zmniejsza wytwarzanie

zapalnych cytokin, w tym czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α) i interleukiny 1 beta (IL-1 β), powodując działanie przeciwzapalne [22, 136]. Hypocynkemia towarzyszy podwyższony poziom mediatorów stanu zapalnego, np. RFT i peptydów przeciwdrobnoustrojowych, takich jak kalprotektyna lub MMP, które powodują uszkodzenie tkanek, zwłaszcza wątroby, płuc i śledziony [152].

Cynk ma udowodnione działanie przeciwwirusowe. Wykazano że zapobiega świńskiej grypie (H1N1) [119]. W związku z tym wielu badaczy przypuszcza, że związki tego metalu mogą być stosowane jako uzupełnienie terapii COVID-19 [129, 167].

Cynk odgrywa istotną rolę w zachowaniu stabilności struktury i funkcji ludzkiego genomu [58]. Deficyt cynku może prowadzić do zwiększonej produkcji RFT, co z kolei skutkuje pęknięciem nici i oksydacyjnymi modyfikacjami DNA, a tym samym przyczynia się do procesu transformacji nowotworowej [170]. Ponadto, jak wspomniano wcześniej biopierwiastek ten występuje w polimerazie DNA i RNA oraz w białkach zawierających tzw. „palce cynkowe”, do których zalicza się jądrowe czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za kontrolę proliferacji i różnicowania komórek. Przykładem jest białko A20, którego ekspresję indukuje cynk. Dodatkowo wykazano, że suplementacja cynkiem poprzez zwiększenie ekspresji mRNA dla tego białka, hamuje aktywację NF κ B, który jest istotnym czynnikiem w procesie onkogenezy i progresji nowotworu [131].

Ponadto jony Zn²⁺ uczestniczą w apoptozie komórek. Suplementacja cynkiem zapobiega aktywacji kaspazy 9, przerywając tym samym zaprogramowaną śmierć komórki i aktywując proliferację komórek uszkodzonych [35].

Zn zapewnia też prawidłowe funkcjonowanie narządów rozrodczych zarówno męskich, jak i żeńskich. Jest konieczny do syntezy hormonów gonadotropowych - hormonu folikulotropowego (FSH) i hormonu luteinizującego (LH) oraz testosteronu. Wykazano, że zawartość Zn w nasieniu jest od 85 do 90 razy wyższa niż we krwi, a jego niedobór w diecie skutkuje powstaniem niskiej jakości nasienia, a także idiopatyczną niepłodnością męską [146]. Ponadto odpowiednie stężenie tego biopierwiastka w organizmie matki jest potrzebne dla prawidłowego rozwoju płodu (wytworzenia mózgu, serca, podniebienia, warg, płuc i układu płciowego i moczowego) [146].

Inną ważną funkcją cynku w organizmie jest jego udział w regulacji glikemii poprzez wpływ na syntezę, gromadzenie i wydzielanie insuliny w komórkach β trzustki. Jony Zn²⁺ biorą też udział w regulacji wydzielania glukagonu oraz aktywacji trzustkowych enzymów trawiennych [152].

Utrzymanie stężeń Zn^{2+} na normalnym poziomie jest niezbędne dla zdrowia psychicznego człowieka, w tym prawidłowego przebiegu procesów poznawczych, regulacji nastrojów oraz uczenia się. Brak równowagi w homeostazie tego biopierwiastka stwierdzono m.in. w chorobie Alzheimera, Parkinsona, depresji, stwardnieniu rozsianym czy schizofrenii [152].

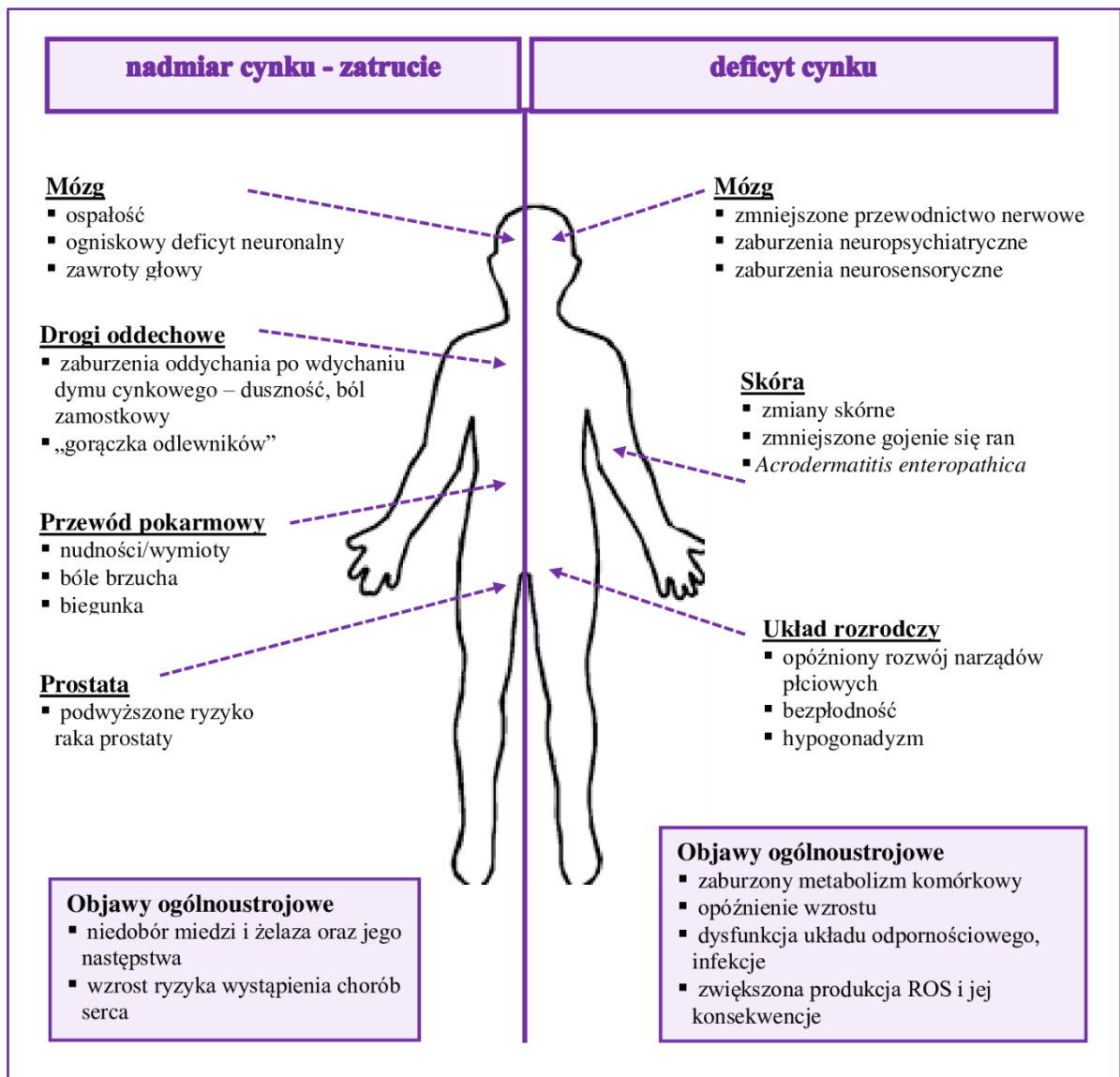
Niedobór tego pierwiastka jest powiązany z wypadaniem włosów. Cynk odpowiada za metabolizm kolagenu, podziały komórkowe w macierzy włosa oraz jest aktywatorem licznych enzymów kontrolujących produkcję białek włosa [75].

2.2.3 Zatrucie cynkiem

Pomimo, iż cynk jest jednym z biopierwiastków, koniecznych do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu, to jego nadmiar może być szkodliwy. Na Rycinie 4 porównano skutki zdrowotne zatrucia cynkiem z niedoborem tego biopierwiastka.

Zatrucie pokarmowe tym pierwiastkiem występuje rzadko ze względu na istnienie mechanizmów regulacyjnych w przewodzie pokarmowym. Opisano przypadki zatrucia ostrego, wynikające ze spożycia owoców i warzyw opryskiwanych preparatami cynku lub pokarmów i napojów przechowywanych w pojemnikach ocynkowanych. Do objawów zatrucia ostrego tą drogą można zaliczyć zaburzenia żołądkowo-jelitowe (nudności, wymioty, biegunka, ból w nadbrzuszu) oraz ospałość, zmęczenie, zawroty głowy i niedokrwistość [96, 104, 145].

Zatrucie przewlekłe tym metalem dotyka przede wszystkim pracowników przemysłu wydobywczego i przetwórczego. Powstające w procesie wytapiania, odlewania czy spawania drobne cząsteczki tlenku cynku ($< 1 \mu m$) wnikają do płuc i prowadzą do wystąpienia zespołu objawów nazywanych „gorączką odlewników”. Do wczesnych symptomów tego zatrucia zalicza się metaliczny smak w ustach oraz podrażnienie gardła. Następnie pojawia się gorączka, dreszcze, ból głowy, bolesność mięśni, wzmożona potliwość, ogólne osłabienie oraz objawy ze strony układu oddechowego, w tym ból zamostkowy i duszność. Gorączce towarzyszy obniżenie wskaźników czynnościowych płuc (objętość oddechowa, wymuszona pojemność wdechowa i wydechowa, pojemność życiowa) [96, 103, 104]. Objawy oddechowe są odwracalne i na ogół ustępują po 1–4 dniach [103].



Rycina 4. Porównanie skutków zatrucia z niedoborem cynku w organizmie [75, 103, 104, 143, 145, 146, 152].

Na podstawie istniejących danych literaturowych można stwierdzić, że wchłanianie cynku przez skórę nie stanowi znaczącego zagrożenia toksykologicznego. Jedynie chlorek cynku wykazuje wyraźne działanie drażniące na skórę [104].

Długotrwała suplementacja cynkiem (>40 mg/24h) jest przyczyną występowania interakcji między cynkiem i innymi biopierwiastkami, w tym miedzią i żelazem. Jony Zn^{2+} zmniejszają wchłanianie miedzi, co skutkuje inhibicją aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD) i ceruloplazminy oraz absorpcją żelaza czego wynikiem może być obniżenie stężenia hemoglobiny, anemia syderoblastyczna, neutropenia i makrocytoza [96].

Ponadto długotrwałe spożywanie nadmiernych ilości cynku może prowadzić do dysfunkcji układu immunologicznego oraz wzrostu ryzyka wystąpienia chorób serca poprzez wzrost poziomu cholesterolu całkowitego w surowicy krwi oraz obniżenie frakcji cholesterolu o wysokiej gęstości (HDL) [32, 96].

Także stosowane w biomedycynie, kosmetyce i przemyśle nanocząstki tlenku cynku mogą być przyczyną zatrucia tym metalem [138]. Dostępne wyniki badań wskazują na skłonność tych związków do kumulacji m.in. w nerkach, płucach, śledzionie i wątrobie oraz rozwoju miażdżycy poprzez zwiększone przyleganie monocytów do śródbłonna naczyń [138].

2.2.4 Rola cynku w zdrowiu i chorobie jamy ustnej

W jamie ustnej cynk jest naturalnie obecny w ślinie, płytce nazębnej oraz w twardych tkankach zębów. W praktyce stomatologicznej zaś związki cynku, takie jak tlenek cynku, chlorek, cytrynian, mleczan i siarczan są stosowane w różnych produktach do pielęgnacji jamy ustnej, jako pasty do zębów i płukanki do ust, aby kontrolować tworzenie się płytki nazębnej i hamować odkładanie kamienia nazębnego. Ponadto sole tego metalu hamują produkcję lotnych związków siarki, przyczyniając się w ten sposób do zmniejszenia nieprzyjemnego zapachu z ust [36, 80, 145]. Suplementacja cynkiem wspomaga leczenie zapalenia dziąseł, przyzębia czy cuchnącego oddechu, podczas gdy niedobór tego pierwiastka jest związany z osłabieniem prawidłowego funkcjonowania jamy ustnej i przyzębia [7, 36, 113, 145, 169].

W surowicy pacjentów z liszajem płaskim, nawracającym, aftowym zapaleniem jamy ustnej (RAS), zespołem pieczenia jamy ustnej (BMS) oraz kserostomią stwierdzono zdecydowanie niższe poziomy cynku niż u osób zdrowych [7, 36, 52, 160].

Rosing i wsp. [113] u pacjentów, którzy stosowali do płukania ust płyn zawierający chlorek cetylopirydyniowy (CPC) i 0,28% mleczanu cynku przez okres sześciu tygodni wykazali większe zmniejszenie płytki nazębnej i wskaźników dziąsłowych niż w przypadku

stosowania płynu z samym CPC. Mehdipour i wsp. [89] w swoim badaniu stwierdzili, że płyn do płukania jamy ustnej zawierający cynk był skuteczny w procesie gojenia się ran i leczeniu nawracającego aftowego zapalenia jamy ustnej.

W innym badaniu, w którym oceniano wpływ niedoboru cynku na tkankę jamy ustnej szczurów, zwierzęta karmiono dietą ubogą lub bogatą cynkową. Wykazano większą, średnią głębokość kieszonek dziąsłowych u szczurów z niedoborem cynku w porównaniu do suplementowanych tym metalem. Ponadto u zwierząt z niedoborem Zn stwierdzono również liczne afte na dnie jamy ustnej, których u szczurów karmionych dietą bogatocynkową nie było. Autorzy powyższego badania wnioskuje, że stan zdrowia jamy ustnej i przyzębia był lepszy u szczurów suplementowanych cynkiem niż u szczurów z niedoborem tego biopierwiastka [128].

Suplementacja cynkiem jest skuteczna w prewencji chorób dziąseł, a szczególnie w walce z patogenami takimi, jak *Fusobacterium nucleatum* i *Prevotella intermedia*, które powodują zapalenie dziąseł. Cynk hamuje również proteazy wytwarzane przez *Porphyromonas gingivalis*, a nanocząstki tlenku cynku zaburzają integralność błony komórkowej w gatunkach *Campylobacter* [36].

W 6-miesięcznym badaniu klinicznym porównano dwa rodzaje past do zębów. Jedna zawierała sam fluor, a druga fluor i cynk. Środek do czyszczenia zębów oparty na cynku zapewnił znaczącą redukcję płytki nazębnej i zmniejszenie objawów klinicznych zapalenia dziąseł [169]. W innym badaniu udowodniono, że pasta do zębów zawierająca fluor i cynk skuteczniej zapobiega demineralizacji szkliwa i hamuje powstawanie płytki nazębnej, która przyczynia się do rozwoju próchnicy [36].

Oceniano też rolę cynku w trakcie rozwoju narządu żucia. Niedawne badanie kliniczne potwierdziło, że suplementacja cynkiem kobiet ciężarnych była skorelowana ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia rozszczepu wargi i/lub podniebienia [98].

Badano też homeostazę cynku i innych pierwiastków śladowych, w tym miedzi i żelaza w stanie przednowotworowym jakim jest zwłóknienie podśluzówkowe jamy ustnej (OSMF). Yadav i wsp. [155] stwierdzili niższy poziom cynku i żelaza oraz wyższy poziom miedzi w surowicy pacjentów z OSMF niż w grupie kontrolnej. Autorzy sugerują, że obserwowany niski poziom cynku może wynikać z faktu iż komórki nowotworowe potrzebują więcej cynku i obniżają jego poziom w surowicy lub może być wynikiem interakcji pomiędzy Zn i Cu. Dodatkowo niedobór cynku hamuje aktywność SOD u pacjentów z OSMF oraz zwiększa aktywność cyklooksygenazy-2 (COX-2), która z kolei hamuje apoptozę jednocześnie nasilając proliferację komórek i przyczynia się w ten sposób do złośliwej transformacji OSMF w raka jamy ustnej [116]. Dlatego odpowiedni poziom cynku jest ważny, aby zapobiec tym zmianom

[116, 107]. Autorzy powyższych badań wskazują, że stężenie Zn w surowicy może być potencjalnym markerem w diagnostyce i rokowaniu OSMF oraz mieć znaczenie ochronne przed inicjacją i progresją nowotworu [107, 116].

2.3 Źródła wolnych rodników i procesy oksydacyjno-redukcyjne w jamie ustnej.

Długotrwały stres wywiera niekorzystny wpływ na nasze zdrowie, w tym zdrowie jamy ustnej i jest uważany za przyczynę zapalenia dziąseł, zębów i kości, owrzodzenia dziąseł (afty), nadmiernej suchości (kserostomii), bruksizmu, zespołu Sjögrena, tworzenia płytki nazębnej, powstawania zmian okołowierzchołkowych, a także nowotworów jamy ustnej [65, 74, 120, 151, 169].

Jama ustna stanowi jedno z niewielu miejsc w ludzkim organizmie, które jest narażone na działanie licznych czynników zewnętrznych, takich jak zanieczyszczenia powietrza, żywności i wody pitnej, drobnoustroje (bakterie, grzyby i wirusy), a także alkohol, leki, materiały stomatologiczne oraz substancje szkodliwe zawarte w dymie papierosowym. Część z nich wykazuje znaczny potencjał utleniający i zdolność do generowania wolnych rodników tlenowych, co może prowadzić do niekorzystnych skutków zdrowotnych nie tylko w obrębie jamy ustnej ale i całego organizmu [177].

Zapalenie przyzębia jest jednym z podstawowych źródeł wolnych rodników w jamie ustnej [141]. Brak równowagi pomiędzy florą bakteryjną zlokalizowaną w kieszonkach przyzębnych, a mechanizmami obronnymi gospodarza, w tym uwalnianie RFT z neutrofilii, skutkuje uszkodzeniem tkanek przyzębia [51, 141, 151]. Udowodniono, że stres oksydacyjny osłabia strukturę włókien kolagenowych i metalloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (np. poprzez wzrost aktywności osteoklastów) i zwiększa produkcję mediatorów zapalenia [4]. Ponadto nadmierna produkcja RFT może skutkować zaburzeniem syntezy proteoglikanów i depolimeryzacją kwasu hialuronowego prowadząc do zaniku integralności tkanek przyzębia i osłabienia ich właściwości biochemicznych [151].

Dostępne dane literaturowe wskazują na możliwość wykorzystania markerów stresu oksydacyjnego w płynie dziąsłowym, ślinie i surowicy w diagnostyce różnych typów paradontozy [51]. Obniżenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w tym materiale biologicznym stwierdzono u pacjentów z przewlekłym i/lub agresywnym zapaleniem przyzębia w porównaniu z osobami zdrowymi [51, 141]. Jednak Acquier i wsp. [1] wykazali znacznie wyższą produkcję RFT i wyższe stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym, jako markerem uszkodzenia lipidów, tylko w ślinie pacjentów z agresywnym zapaleniem przyzębia w przeciwieństwie do osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia.

Biorąc pod uwagę fakt, że stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę w patogenezie paradontozy, od dawna sugerowano, że suplementacja antyoksydantami może zmniejszyć lub spowolnić uszkodzenia przyzębia. Badania Ambati i wsp. [4] oraz Tothova i Celec [141] dostarczają dowodów na skuteczność terapii antyoksydacyjnej w zapaleniu przyzębia. Muniz i wsp. [97] udowodnili większą skuteczność antyoksydantów lipofilowych (takich jak witamina E) w przeciwieństwie do antyoksydantów hydrofilowych.

Stres oksydacyjny zaliczany jest również do głównych czynników mających destrukcyjny wpływ na gruczoły ślinowe m.in. w przebiegu chorób metabolicznych (otyłość, cukrzyca typu 1 i 2), neurodegeneracyjnych (demencje, choroba Alzheimera) oraz autoimmunologicznych (reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Sjögrena, twardzina układowa) [23, 37, 142, 164, 165].

Także codzienne spożywanie pokarmów wpływa na procesy utleniania i redukcji w jamie ustnej. W żywności są bowiem zawarte substancje zarówno utleniające, jak i redukujące, które mogą wpływać, przynajmniej czasowo, na stan oksydacyjno-redukcyjny jamy ustnej. Spożywanie nadmiernej ilości kalorii, a także dieta wysokobiałkowa i wysokotłuszczowa może zwiększać produkcję wolnych rodników w jamie ustnej oraz osłabiać potencjał antyoksydacyjny i wzmacniać oksydacyjne uszkodzenia DNA, białek i lipidów [66, 67, 166]. Natomiast korzystne działanie wykazują antyoksydanty zawarte m.in. w herbacie, kawie, czerwonym winie czy miodzie, a ich spożywanie może zmniejszać produkcję RFT i chronić przed uszkodzeniami oksydacyjnymi w jamie ustnej [4, 29, 176]

Również spożywanie alkoholu etylowego (EtOH) pod różnymi postaciami, ma wpływ na zachodzące w jamie ustnej procesy oksydacyjne. Metabolizm EtOH generuje powstawanie wolnych rodników, zwłaszcza anionu ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru, pośrednio poprzez regulację wielu szlaków prooksydacyjnych i bezpośrednio przez dehydrogenazę alkoholową (ADH), katalazę i aktywację CYP2E1. Ponadto nadekspresja indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) generuje reaktywne formy azotu (RNS) [40]. EtOH zaburza również aktywność mitochondriów i nieenzymatyczną barierę antyoksydacyjną poprzez obniżenie stężenia glutationu. W konsekwencji obserwuje się uszkodzenie mięszu i dysfunkcję gruczołów ślinowych [134]. Zmiany przedrakowe oraz rak jamy ustnej i gardła, owrzodzenie błon śluzowych czy sialoadenoza ślinianki przyusznej są efektem modyfikacji oksydacyjnych związków z przewlekłym spożywaniem alkoholu [177].

Dym papierosowy zawiera wiele toksycznych substancji, w tym związki o działaniu prooksydacyjnym i rakotwórczym [43, 73, 169]. Ogromna liczba i różnorodność wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, azotu i węgla w dymie papierosowym sprawia, że jest to

jeden z najsilniejszych induktorów stresu oksydacyjnego, który prowadzi m.in. do osłabienia mechanizmów obronnych śliny, w tym bariery antyoksydacyjnej, co skutkuje rozwojem chorób jamy ustnej, które częściej występują u palaczy niż u niepalących. Wykazano, że substancje utleniające zawarte w dymie papierosowym odgrywają kluczową rolę w rozwoju raka, ponieważ łatwo reagują z DNA prowadząc do zmiany zasad, zerwania nici i indukcji ekspresji protoonkogenów. Szacuje się, że dym papierosowy zwiększa wskaźnik uszkodzenia oksydacyjnego DNA o 35–50%. Narażenie na dym papierosowy odpowiada za 50–90% przypadków raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, ponadto ryzyko zachorowania na ten rodzaj raka jest 7-10 razy większe u palaczy niż u niepalących [169]. Palenie tytoniu zwiększa również ryzyko zapalenia przyzębia, stanów zapalnych tkanek wokół implantu zęba, próchnicy, zapalenia kości wyrostka zębodołowego i halitozy, chociaż te choroby mniej zagrażają życiu niż rak płaskonabłonkowy [43].

Należy również zaznaczyć, że kadm zawarty w dymie papierosowym może zastąpić żelazo i miedź w białkach cytoplazmatycznych zwiększając w ten sposób ilość wolnej miedzi i żelaza, co dodatkowo zwiększa stres oksydacyjny poprzez reakcję Fentona [176].

Źródłem RFT w jamie ustnej są także nieinwazyjne, bezbolesne metody leczenia (ozonoterapia, ultradźwięki, światło lasera, promienienie UV, plazma nietermiczna) oraz różne materiały dentystyczne stosowane w leczeniu odtwórczym, higienicznym i ortodontycznym, a także w chirurgii lub implantologii [177].

Popularnymi materiałami dentystycznymi stosowanymi do odbudowy zepsutych, zniszczonych lub uszkodzonych zębów są żywice kompozytowe, których największą zaletą jest możliwość dostosowania ich koloru do barwy zębów. Składają się one z organicznej macierzy polimerowej (np. dimetakrylan i tetrametakrylan uretanu, dimetakrylanu glikolu, dimetakrylan bisfenylu), czynnika wiążącego i cząstek wypełniacza. Właściwości fizykochemiczne kompozytów i ich biokompatybilność z tkanką zęba, są zależne od efektywnej polimeryzacji monomerów, która niestety nigdy nie jest pełna. Udowodniono, że monomery resztkowe zubożają wewnątrzkomórkowy zapas glutationu, a obniżenie jego stężenia skutkuje obniżeniem aktywności peroksydazy glutationowej i zwiększeniem stężenia nadtlenu wodoru [71, 126]. Wykazano, że komórki naczyniowe miazgi zęba w wyniku ekspozycji na niebieskie światło wykorzystywane do polimeryzacji żywicy generują znaczne ilości RFT, w tym anion ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, tlen singletowy oraz nadtlenuki lipidowe [162].

Ze stałych aparatów ortodontycznych uwalniane są znaczne ilości jonów metali, które wytwarzają RFT na drodze pośredniej poprzez reakcję Fentona (nikiel, kobalt) lub bezpośrednio (chrom) [135]. Buczko i wsp. [18] u osób używających standardowego łuku

niklowo-chromowego stwierdzili pozytywną korelację pomiędzy stężeniem niklu, a poziomem RFT w ślinie tych pacjentów. Natomiast Spalij i wsp. [135] wykazali, że łuki miedziano-niklowo-tytanowe, tytanowo-molibdenowe i kobaltowo-chromowe mogą również indukować stres oksydacyjny ale jest on znacznie mniej nasilony niż w przypadku standardowego łuku niklowo-chromowego.

Powszechnie wiadomo, że duże i małe gruczoły ślinowe stanowią istotną część jamy ustnej, a wytwarzana przez nie ślina pełni nie tylko funkcję buforującą, przeciwbakteryjną i remineralizującą, ale jest także bogatym źródłem enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów, co pozwala na utrzymanie równowagi redoks i zapobiega jej zaburzeniom nie tylko w jamie ustnej, ale i w całym organizmie [24, 177]. Do enzymatycznych antyoksydantów obecnych w ślinie należą dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydazy, tj. laktoperoksydaza (peroksydaza ślinowa) oraz mieloperoksydaza [125]. Enzymy te, oprócz redukcji toksycznego nadtlenu wodoru hamują drobnoustroje obecne w jamie ustnej poprzez reakcję oksydacji obecnych w ślinie tiocyjanianów do kwasu hypotiocyjanowego [125, 133].

Istotny udział we właściwym funkcjonowaniu bariery antyoksydacyjnej śliny mają również przeciwutleniacze nieenzymatyczne, w tym glutation, kwas askorbinowy, tokoferole i tokotrienole oraz kwas moczowy, który odpowiada za niemalże 70% jej aktywności antyoksydacyjnej [24, 72, 125].

W związku z tym należy uznać, że jama ustna jest pierwszą linią obrony organizmu przeciwko wolnym rodnikom tlenowym.

III. Cel i założenia pracy

Kadm jest jednym z głównych zanieczyszczeń środowiska stwarzającym potencjalne zagrożenie zdrowia ludzi i zwierząt. Długotrwałe narażenia na ten metal obok dysfunkcji nerek prowadzi do zmian w układzie kostnym o charakterze osteoporozy ze zwiększoną częstością złamań.

Skutki działania kadmu na organizmy żywe oraz mechanizmy tego wpływu od lat budzą zainteresowanie badaczy. Z uwagi na coraz liczniejsze doniesienia i prognozy, że ekspozycja na ten metal będzie rosła [122, 123, 150] oraz fakt, że aktualne narażenie środowiskowe na kadm stwarza ryzyko dla zdrowia, w badaniach doświadczalnych poszukuje się sposobów, które pozwolą zapobiegać skutkom ekspozycji na ten pierwiastek. Dostępne dane wskazują, że z uwagi na działanie prooksydacyjne kadmu i udział stresu oksydacyjnego w mechanizmach jego działania skuteczne pod tym względem mogą być substancje o właściwościach przeciwutleniających, w tym cynk [86, 87].

Badania ostatnich lat wykazały, że podawanie tego biopierwiastka zwierzętom doświadczalnym podczas ekspozycji na kadm może chronić przed kumulacją tego toksycznego metalu w organizmie i zapobiegać licznym skutkom jego działania, w tym uszkodzeniom tkanki kostnej [15, 16]. Z perspektywy lekarza dentystry ważna jest ocena toksycznego wpływu kadmu na kości narządu żucia oraz roli cynku w zapobieganiu skutkom tego działania. Jednak takich badań dotychczas nie prowadzono. Wykazano jedynie, że kadm obecny w żywności i wodzie pitnej oraz nałogowe palenie może przyczyniać się do powstawania przebarwień i ubytków w szkliwie zębów, rogowacenia błony śluzowej jamy ustnej i indukcji procesów zapalnych w tkankach przyzębia [73]. Natomiast badania kliniczne dowodzą, że jony cynku zmniejszają szybkość demineralizacji kości i szkliwa oraz nieprzyjemny zapach z ust, a także odgrywają istotną rolę w utrzymaniu zdrowia przyzębia ze względu na miejscowy, przeciwzapalny wpływ tego biopierwiastka na tkanki miękkie jamy ustnej [48, 80, 145].

Ponadto wyniki badań z ostatnich lat wskazują, że kadm na drodze stresu oksydacyjnego może prowadzić do zaburzeń w metabolizmie tkanki kostnej, a stan oksydacyjno-redukcyjny tej tkanki ma bezpośredni wpływ na aktywność tych procesów [109, 124]. Ponieważ cynk wykazuje właściwości przeciwutleniające i może chronić przed rozwojem stresu oksydacyjnego indukowanego przez kadm w narządach mięsaszowych [13, 45, 70, 111] w badaniach własnych za niezbędne uznano ocenę czy zwiększona podaż cynku może chronić przed stresem oksydacyjnym również w tkance kostnej żuchwy.

Hipoteza badawcza

Zwiększona podaż cynku w stosunku do spożycia tego biopierwiastka z dietą standardową podczas chronicznej, umiarkowanej i względnie wysokiej (odpowiednio 5 i 50 mg Cd/dm³) ekspozycji na kadm chroni przed rozwojem stresu oksydacyjnego i uszkodzeniami oksydacyjnymi makrocząsteczek komórkowych (DNA/RNA, białka i lipidy) w tkance kostnej żuchwy i na tej drodze zmniejsza ryzyko uszkodzenia tego narządu.

Aby zbadać postawioną hipotezę dokonano:

- oceny wpływu suplementacji cynkiem na kumulację kadmu w tkance kostnej żuchwy
- oceny wpływu narażenia na kadm na stan oksydacyjno - redukcyjny i stopień uszkodzeń oksydacyjnych kwasów nukleinowych, białek i lipidów w tkance kostnej żuchwy
- oceny długotrwałej suplementacji cynkiem na stan oksydacyjno - redukcyjny tkanki kostnej żuchwy
- oceny czy zwiększona podaż cynku podczas umiarkowanego i względnie wysokiego narażenia przewlekłego na kadm chroni przed rozwojem stresu oksydacyjnego i zapobiega uszkodzeniom oksydacyjnym DNA/RNA, białek i lipidów, w tkance kostnej żuchwy

IV. Materiały i metodyka badań

4.1 Odczynniki i aparatura

Odczynniki i roztwory

W trakcie prowadzenia badań używano następujących odczynników i roztworów:

- acetonitryl (Merck, Darmstad, Niemcy)
- bufor fosforanowy 50 mM o pH = 7,4 przygotowany z diwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4 ; POCh, Gliwice, Polska) i wodorofosforanu dipotasu (K_2HPO_4 ; POCh, Gliwice, Polska)
- bufor fosforanowy 0.2 M o pH = 7,0 przygotowany z diwodorofosforanu sodu (NaH_2PO_4 ; POCh, Gliwice, Polska) i wodorofosforanu disodu (Na_2HPO_4 ; POCh, Gliwice, Polska)
- butylohydroksytoluen (BHT; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy)
- woda redestylowana i ultra czysta
- zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS; Biomed-Lublin, Lublin, Polska)
- 30% H_2O_2 (CHEMPUR; Piekary Śląskie, Polska)
- zestawy diagnostyczne do oznaczania wskaźników stanu oksydacyjno - redukcyjnego oraz stężenia białka.

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Podczas badań korzystano z niżej wymienionej aparatury i sprzętu laboratoryjnego:

- spektrofotometr atomowo - absorpcyjny (HITACHI Z-5000, Tokio, Japonia) wyposażony w kuwetę grafitową (Pyro cuvette A) i lampy z katodą wnątkową do oznaczania metali metodą AAS (Photron, Narre Waren, Australia)
- mineralizator mikrofalowy (Uni Clever II, Plazmatronika, Wrocław, Polska)
- uniwersalny czytnik mikroplitek (EPOCH, BIO-TEK INSTRUMENTS INC., Winooski USA)
- automatyczna płuczka mikroplitek (Thermolabsystems Wellwash 4, Labsystems, Helsinki, Finlandia)
- spektrofotometr (UV-VIS SPECORD 50PLUS, Analytik, Jena, Niemcy) wyposażony w kuwety kwarcowe
- cieplarka (inkubator) (SalvisLAB, Rotkreuz, Szwajcaria)
- pH metr (METTLER TOLEDO, Schwarzenbach, Szwajcaria)
- mikroshaker (IKA-MS-3-Digital, Staufen, Niemcy)
- wirówka laboratoryjna (MPW-350R, Medical Instruments; Warszawa, Polska)
- homogenizator nożowy (Ultra-Turrax T25, IKA, Staufen, Niemcy)
- waga laboratoryjna (AS 60/220R2, Radwag, Radom, Polska)

- system oczyszczania wody (Purewater 300, Purite, Thame, Wielka Brytania)
- drobny sprzęt laboratoryjny (zlewki, probówki i kolby miarowe - szklane i z polipropylenu, probówki typu Eppendorf, pipety automatyczne)

4.2 Zwierzęta i układ doświadczalny

Do badań będących przedmiotem niniejszej pracy wykorzystano kości żuchwy szczurów, które pobrano i zabezpieczono podczas eksperymentu wcześniej prowadzonego w Zakładzie Toksykologii UM w Białymstoku, na który uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku (nr opinii 2004/03).

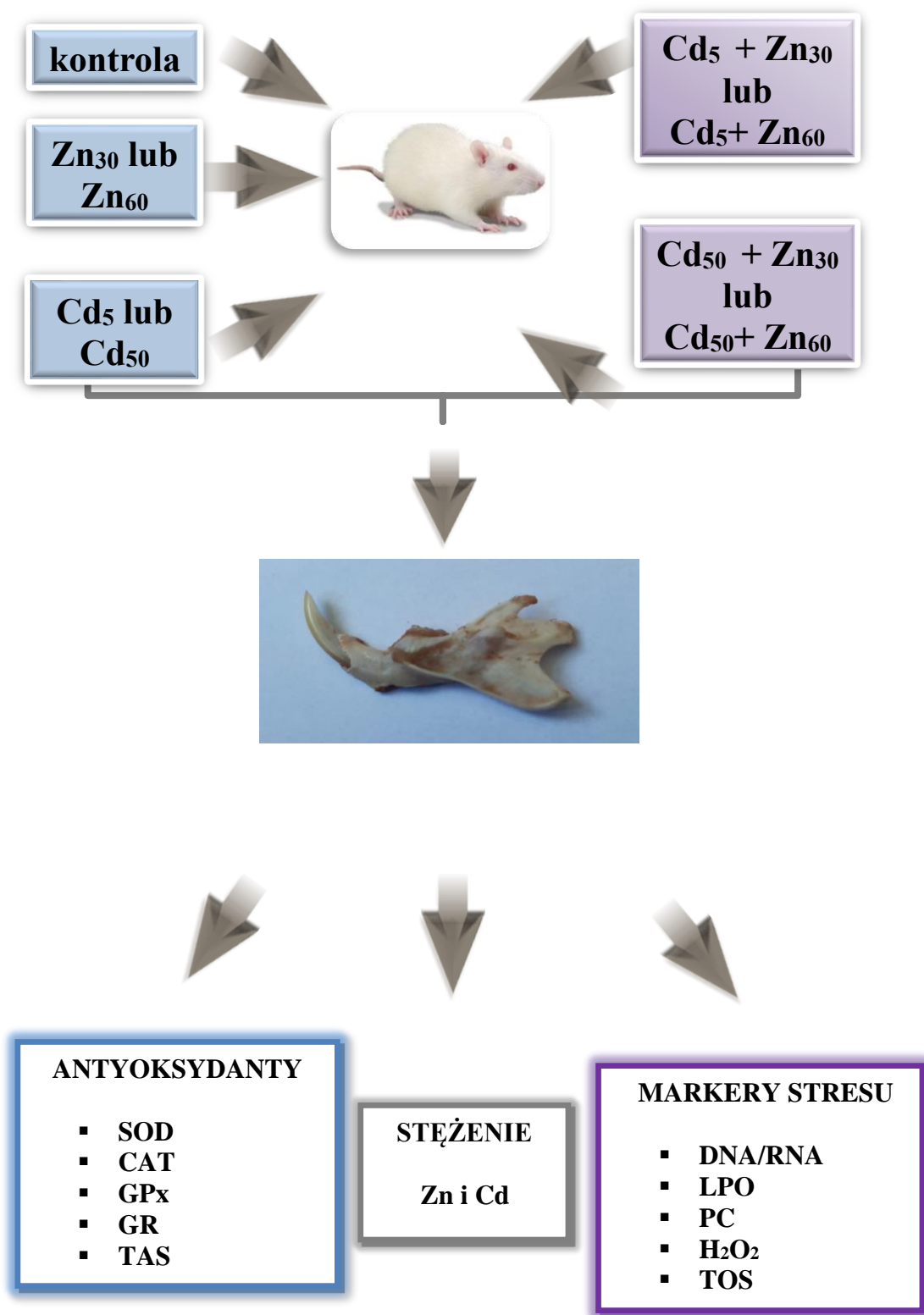
Badania przeprowadzono na 72 dorosłych szczurach, samcach szczepu Wistar [CrI:WI(Han)] o początkowym ciężarze ciała 220g. Doświadczenie trwało 12 miesięcy. W trakcie trwania badań zwierzęta znajdowały się w klatkach ze stali nierdzewnej, w pomieszczeniu, w którym były standardowe warunki hodowlane (wilgotność względna $50 \pm 10\%$, temperatura 22 ± 2 °C, 12-godzinny cykl dobowy) i miały nieograniczony dostęp do wody pitnej oraz standardowej diety typu LSM (Agropol; Motycz, Polska), która zawierała 1.11% Ca, 0.72% P, 1 IU witaminy D₃/g, 48 µg Zn/g (dane producenta) oraz 0,098 µg Cd/g [16]. Szczury zostały podzielone losowo na 9 grup, z których każda liczyła 8 osobników (Rycina 5).

Układ doświadczalny przedstawiał się następująco:

- **Grupa kontrolna (K)** – szczury przez cały okres eksperymentu otrzymywały do picia wodę wolną od zanieczyszczeń i paszę standardową typu LSM
- **Grupa Zn30** – zwierzętom podawano, jako jedyny płyn do picia, wodny roztwór chlorku cynku (ZnCl₂) o stężeniu 30 mg Zn/dm³ i paszę standardową typu LSM
- **Grupa Zn60** – zwierzętom podawano, jako jedyny płyn do picia, wodny roztwór chlorku cynku (ZnCl₂) o stężeniu 60 mg Zn/dm³ i paszę standardową typu LSM
- **Grupa Cd5** – szczurom podawano, jako jedyny płyn do picia, wodny roztwór chlorku kadmu (CdCl₂) o stężeniu 5 mg Cd/dm³ oraz paszę standardową typu LSM
- **Grupa Cd5 + Zn30** – zwierzętom podawano, jako jedyny płyn do picia, wodny roztwór CdCl₂ w stężeniu 5 mg Cd/dm³ i ZnCl₂ w stężeniu 30 mg Zn/dm³ oraz paszę standardową typu LSM

- **Grupa Cd5 + Zn60** – zwierzętom podawano, jako jedyny płyn do picia, wodny roztwór CdCl₂ w stężeniu 5 mg Cd/dm³ i ZnCl₂ w stężeniu 60 mg Zn/dm³ oraz paszę standardową typu LSM
- **Grupa Cd50** – szczurom podawano, jako jedyny płyn do picia, wodny roztwór CdCl₂ o stężeniu 50 mg Cd/dm³ oraz paszę standardową typu LSM
- **Grupa Cd50 + Zn30** – zwierzętom podawano, jako jedyny płyn do picia, wodny roztwór CdCl₂ w stężeniu 50 mg Cd/dm³ i ZnCl₂ w stężeniu 30 mg Zn/dm³ oraz paszę standardową typu LSM.
- **Grupa Cd50 + Zn60** – zwierzętom podawano, jako jedyny płyn do picia, wodny roztwór CdCl₂ w stężeniu 50 mg Cd/dm³ i ZnCl₂ w stężeniu 60 mg Zn/dm³ oraz paszę standardową typu LSM.

72 samce szczura szczepu Wistar



Rycina 5. Schemat modelu doświadczalnego z uwzględnieniem wykonanych badań.

Dodatek $ZnCl_2$ do wody pitnej w stężeniu 30 i 60 mg Zn/dm^3 pozwolił zwiększyć dobową podaż tego biopierwiastka odpowiednio o 71% i 146% w porównaniu z jego spożyciem z dietą standardową [16].

Dobowe spożycie cynku w grupach, którym podawano ten biopierwiastek w stężeniu 30 i 60 mg Zn/dm^3 osobno, jak i podczas narażenia na kadm było na tym samym poziomie i mieściło się w zakresie 0.980 - 3.980 mg/kg m.c. oraz 2.020 - 7.710 mg/kg m.c i wynosiło średnio (średnia \pm błąd standardowy (SE)) odpowiednio $1,904 \pm 0,123$ mg/kg m.c. i $3,699 \pm 0,213$ mg/kg m.c. [16].

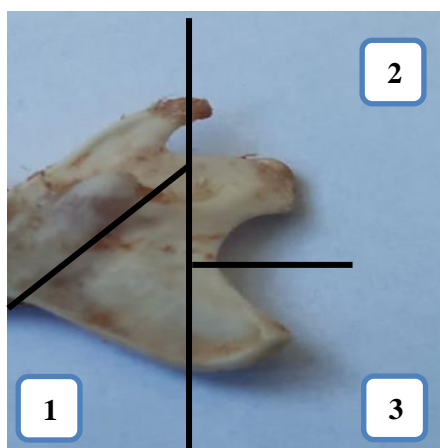
Podawanie szczurom w wodzie pitnej $CdCl_2$ w stężeniu 5 i 50 mg Cd/dm^3 odzwierciedla umiarkowane i względnie wysokie narażenie człowieka na ten ksenobiotyk. Dobowe spożycie tego metalu toksycznego osobno i łącznie z cynkiem mieściło się w zakresie odpowiednio 0,163 - 0,753 mg/kg m.c. oraz 1.740 - 4.440 mg/kg m.c. i wynosiło średnio $0,340 \pm 0,026$ mg/kg m.c. i $2,498 \pm 0,093$ mg/kg m.c. [16].

Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta wprowadzono w stan głębokiej narkozy barbituranowej (podanie dootrzewne Vetbutalu w dawce 30 mg/kg m.c.). Pobrano krew z serca oraz tkanki i narządy, wliczając kości żuchwy. Narządy zostały wypłukane w soli fizjologicznej (0,9% chlorek sodu) i osuszone przy pomocy bibuły. Następnie zważono je i zamrożono ($-80^\circ C$) do czasu wykonania badań.

Kości żuchwy dodatkowo zostały zabezpieczone przed wysychaniem folia aluminiową.

4.3 Metodyka badań

4.3.1 Przygotowanie homogenatów z kości żuchwy.



Rycina 6. Kość żuchwy szczura (pobrana w trakcie doświadczenia).

Kości żuchwy po oczyszczeniu z tkanek miękkich, dzielono na 3 części (Ryc. 6). Pierwszą, poddano homogenizacji w zimnym buforze fosforanowym o pH = 7,4 przy użyciu homogenizatora nożowego (Ultra-Turrax T25 firmy IKA) w celu sporządzenia 10% homogenatów. Aby zapobiec autooksydacji badanego materiału do prób dodawano 0.5M BHT w acetonitrylu (0.01cm³ na 1cm³ homogenatu). Bezpośrednio po przygotowaniu homogenaty dzielono na 2 porcje i wirowano. Jedną do znaczeń CAT, TAS, LPO, H₂O₂ i TOS wirowano 700 x g przez 20 minut w temperaturze 4°C, drugą do oznaczania SOD, GPx i GR 20 000 x g przez 30 minut w temperaturze 4°C, po czym niezwłocznie oddzielono supernatant. Uzyskany nadsącz przechowywano w stanie zamrożenia (-80°C) do czasu wykonania zaplanowanych oznaczeń [117].

Drugą część (dokładnie po 0,1 g) wykorzystano do oznaczeń oksydacyjnych uszkodzeń DNA/RNA (8-hydroksyguanozyna (8-OHG), 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG) i 8-hydroksyguanina). Ekstrakcję materiału genetycznego z kości żuchwy prowadzono zgodnie z procedurą Nuclear Extraction Kit firmy Cayman.

W trzeciej części oznaczono stężenie Zn i Cd.

4.3.2 Oznaczanie stężenia cynku i kadmu

Stężenie kadmu i cynku w tkance kostnej żuchwy oznaczono metodą spektrometrii atomowo absorpcyjnej (AAS) z użyciem mineralizatora Uni Clever II firmy Plazmatronika z wykorzystaniem metody elektrotermicznej na spektrometrze Z-5000 firmy Hitachi wyposażonym w kuwetę grafitową (Pyro kuweta A, Hitachi) oraz lampę z katodą wnątkową do oznaczania metali metodą ASA (Photron, Narre Waren, Australia).

Stężenie Cd i Zn oznaczone w jednocześnie analizowanym materiale referencyjnym było zgodne z wartością podaną przez producenta (popiół kostny referencyjny nr 1400, Narodowy Instytut Norm i Technologii; Gaithersburg, USA).

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności (CV) dla pomiarów Cd i Zn wynosiła < 3%.

4.3.3 Antyoksydanty

Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx)

Do oznaczenia aktywności GPx wykorzystano zestaw Bioxytech® GPx-340™ firmy Oxis Research™ division of AOXRE LLC (Burlingame, CA, USA) składający się z:

- ❑ buforu do oznaczeń o pH = 7,6, który jest gotowy do użycia
- ❑ NADPH, który rozcieńczono przed użyciem dodając do fiolki 7,5 cm³ buforu do oznaczeń
- ❑ nadtlenu tert – butylu, który rozcieńczono przed użyciem wodą ultra czystą w stosunku 1:10 000

Zasada metody

GPx katalizuje rozkład H₂O₂ do wody z jednoczesnym utlenianiem cząsteczki GSH. Powstający GSSG jest następnie redukowany przez reduktazę glutationową (GR). W reakcji tej NADPH utleniany jest do NADP⁺, co wiąże się z obniżeniem absorbancji mierzonej przy długości fali 340 nm. Obniżenie absorbancji jest wprost proporcjonalne do aktywności GPx w próbce.

Wykonanie oznaczenia:

- ❑ do kuwety spektrofotometrycznej dodano po 350 µl buforu do oznaczeń i rozcieńczonego NADPH oraz 70 µl próby
- ❑ następnie umieszczono kuwetę w spektrofotetrze i dodano 350 µl rozcieńczonego nadtlenku tert – butylu
- ❑ dokonano pomiaru absorbancji (Abs) metodą kinetyczną (7 pomiarów co 30 sek.) przy długości fali $\lambda = 340$ nm i wyliczono zmianę absorbancji na minutę (Δ Abs/min)
- ❑ aktywność GPx obliczano ze wzoru:

$$\text{GPx mU/ml} = (\Delta\text{Abs/min} / 0.00622) \times 16$$

gdzie:

- 0.00622 - molowy współczynnik ekstynkcji (ϵ) dla NADPH
- 16 – rozcieńczenie próby

Aktywność GPx w homogenacie żuchwy wyrażono w mU/mg białka.

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności CV była < 4%.

Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu zestawu Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA), który składał się z:

- ❑ buforu do oznaczeń (50 mM Tris-HCl, pH = 8.0 zawierający 0,1 mM DTPA i 0.1 mM hipoksantynę), który przed użyciem rozcieńczono 10 krotnie wodą ultra czystą
- ❑ buforu do prób (50 mM Tris-HCl, pH = 8.0), który przed użyciem rozcieńczono 10 krotnie wodą ultra czystą
- ❑ roztworu standardowego SOD, który przed użyciem rozcieńczono przy użyciu buforu do prób (aktywność SOD od 0 do 0,05 U/ml)
- ❑ detektora rodników (0.25 cm³ soli tetrazoliowej), który przed użyciem rozcieńczono dodając do 0,05 cm³ soli 19.95 cm³ rozcieńczonego buforu do oznaczeń
- ❑ oksydazy ksantynowej (0.15 cm³ r-ru oksydazy ksantynowej), którą przed użyciem rozcieńczono przez dodanie do 0.05 cm³ oksydazy ksantynowej 1.95 cm³ rozcieńczonego buforu do prób

- ❑ płytki 96-dołkowej

Zasada metody

Enzym ten katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru (H_2O_2). W próbce wykrywany jest $O_2^{\cdot-}$ generowany przez oksydazę ksantynową i hipoksantynę, który po dodaniu soli tetrazoliowej tworzy barwny kompleks wykazujący maksimum absorpcji przy $\lambda = 450$ nm.

Wykonanie oznaczenia:

- ❑ do wszystkich dołków mikropłytki dodano po 200 μ l rozcieńczonego detektora rodników
- ❑ do odpowiednich dołków odmierzone po 10 μ l roztworów wzorcowych oraz próbek badanych
- ❑ reakcję zapoczątkowano dodając do każdej studzienki po 20 μ l rozcieńczonej oksydazy ksantynowej
- ❑ mikropłytkę przykryto folią i inkubowano przez 30 min. w temp. pokojowej jednocześnie wytrząsając
- ❑ odczytano absorbcję (Abs) wzorców i prób badanych na czytniku mikropłytek przy długości fali $\lambda = 450$ nm
- ❑ na podstawie zmierzonych Abs roztworów wzorcowych policzono współczynniki liniowości (LR) dla każdego wzorca dzieląc Abs danego wzorca przez Abs wzorca 0
- ❑ następnie sporządzono krzywą wzorcową dla SOD w układzie zależności współczynnik LR danego wzorca - stężenie wzorca (wzór krzywej $y = 29,4x + 1,100$)
- ❑ policzono współczynniki LR dla wszystkich prób (Abs wzorca 0/Abs próby)
- ❑ aktywność SOD obliczono wg. następującego wzoru:

$$SOD \text{ U/ml} = \frac{(LR \text{ próby} - 1,1)}{29,4} \times 23$$

Aktywność SOD w homogenacie żuchwy wyrażono w U/mg białka.

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności (CV) była < 4%.

Oznaczenie aktywności katalazy (CAT)

Aktywność CAT oznaczono metodą spektrofotometryczną wg. Aebi [2]. Zasada metody opiera się na pomiarze szybkości rozkładu H_2O_2 przez ten enzym przy długości fali $\lambda = 240$ nm.

Odczynniki:

- bufor fosforanowy 0,2 M o pH = 7,0 sporządzony z diwodorofosforanu sodu i wodorofosforanu di-sodu
- 30% H_2O_2

Wykonanie oznaczenia:

- do kuwety kwarcowej odmierzone 0,1 cm^3 próby badanej i 0,750 cm^3 buforu fosforanowego o pH = 7,0 (zawierającego 0,1 cm^3 30% H_2O_2 na każde 50 cm^3)
- zawartość kuwety niezwłocznie wymieszano, po czym odczytano wartość obniżenia absorbancji co 5s przez 20s przy $\lambda = 240$ nm.
- obniżenie absorbancji o 0,1 odpowiada rozkładowi przez CAT $3,5 \times 10^{-3}$ g H_2O_2 .

Aktywność CAT w homogenatach żuchwy wyrażono w (mmol H_2O_2 /min/mg białka).

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności CV była < 3%.

Oznaczenie aktywności reduktazy glutationowej (GR)

Do oznaczenia aktywności GR wykorzystano zestaw Bioxytech® GR-340™ firmy Oxis Research™ division of AOXRE LLC, (Burlingame, CA, USA) składający się z:

- buforu do rozcieńczania o pH = 7,6, który jest gotowy do użycia
- NADPH (liofilizat), który rozcieńczono przed użyciem dodając do fiolki 7 cm^3 wody ultra czystej
- GSSG (utleniony glutation w buforze potasowo-fosforanowym zawierającym EDTA o pH 7,5)

Zasada metody

Reduktaza glutationowa katalizuje redukcję utlenionego glutationu (GSSG) do glutationu (GSH). Jednocześnie w reakcji tej jedna cząsteczka NADPH jest utleniana do NADP+, co wiąże się z obniżeniem absorbancji mierzonej przy długości fali 340 nm. Obniżenie absorbancji jest wprost proporcjonalne do aktywności GR w próbce.

Wykonanie oznaczenia:

- do kuwety kwarcowej dodano 100 μ l próby i 200 μ l GSSG, wymieszano i umieszczono kuwetę w spektrofotometrze
- następnie dodano 200 μ l rozcieńzonego NADPH i dokonano pomiaru absorbancji (Abs) metodą kinetyczną (5 pomiarów co 60 sek.) przy długości fali $\lambda = 340$ nm
- wyliczono Δ Abs/min
- aktywność GR obliczano ze wzoru:

$$\text{GR mU/ml} = (\Delta\text{Abs/min} / 0.00622) \times 5$$

gdzie:

- 0.00622 - molowy współczynnik ekstynkcji (ϵ) dla NADPH
- 5 - rozcieńczenie próby

Aktywność GR w homogenacie żuchwy wyrażono w mU/mg białka.

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności CV była <5%.

Oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (TAS)

Stężenie TAS oznaczono przy użyciu zestawu ImAnOx (TAS) Kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Niemcy) składającego się z:

- kalibratora (CAL) o stężeniu 219 μ mol/l (liofilizat, który przed użyciem rozcieńczano dodając 250 μ l roztworu do rozpuszczania)
- prób kontrolnych (CTRL) (liofilizaty, które przed użyciem rozcieńczano dodając po 250 μ l roztworu do rozpuszczania) o stężeniach:
 - CTRL 1 – 170 – 230 μ mol/l

- CTRL 2 – 195 – 263 $\mu\text{mol/l}$
- ❑ buforu reakcyjnego A (REFBUF A) i bufor reakcyjny B (REFBUF B)
- ❑ roztworu nadtlenu (PER)
- ❑ roztworu enzymu (ENZ)
- ❑ roztworu do rozpuszczania (RECSOL)
- ❑ roztworu stop (STOP)
- ❑ 2 płytek 96 dołkowych

Zasada metody

Metoda jest oparta na reakcji antyoksydantów z dodawanym do próby H_2O_2 , którego pozostałość oznacza się fotometrycznie w oparciu o reakcję enzymatyczną i przejście kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego (TMB) do barwnego produktu, którego intensywność jest mierzona przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Wykonanie oznaczenia:

Przygotowanie mieszanin reakcyjnych:

Mieszanina reakcyjna 1

- roztwór podstawowy - 5 ml buforu reakcyjnego A i 10 μl roztworu nadtlenu

Mieszanina reakcyjna 2

- a/** 10 ml buforu reakcyjnego A + 200 μl buforu reakcyjnego B + 10 μl roztworu enzymu
b/ 10 ml buforu reakcyjnego A + 200 μl buforu reakcyjnego B

- ❑ do odpowiednich dołków mikropłytki dodano w 2 powtórzeniach po 10 μl próbek badanych, kalibratora oraz próbek kontrolnych
- ❑ następnie dodano po 100 μl mieszaniny reakcyjnej 1 i po wymieszaniu inkubowano płytki przez 10 min. w temperaturze 37°C .
- ❑ następnie dodano po 100 μl przygotowanej mieszaniny reakcyjnej 2 odpowiednio do połowy 2a (Abs 2a) i 2b (Abs 2b) i inkubowano płytki przez 5 min. w temperaturze pokojowej
- ❑ po inkubacji dodano 50 μl stop roztworu i zmierzono absorbancję przy $\lambda = 450 \text{ nm}$ przy użyciu spektrofotometru

Stężenie TAS obliczono ze wzoru:

$$TAS (\mu\text{mol/l}) = 392 - (392-219) \times \frac{(Abs\ 2a\ próby - Abs\ 2b\ próby)}{(Abs\ 2a\ CAL - Abs\ 2b\ CAL)}$$

Stężenie TAS w homogenacie żuchwy wyrażono w nmol/mg białka.

Wartości TAS oznaczone w próbkach kontrolnych wchodzących w skład zestawu wynosiły $189,5 \pm 7,500$ i $230,0 \pm 13,00$ $\mu\text{mol/l}$ (średnia \pm SEM, $n = 2$) i mieściły się w zakresach wartości podanych przez producenta.

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności CV była $<5\%$.

4.3.4 Markery stresu oksydacyjnego

Oznaczanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA/RNA

Stężenie utlenionych metabolitów guaniny (8-hydroksyguanozyny (8-OHG), 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG) i 8-hydroksyguaniny) oznaczono przy użyciu zestawu DNA/RNA Oxidative Damage (High Sensitivity) ELISA Kit (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA) składającego się z:

- przeciwciała monoklonalne (liofilizat), do którego przed użyciem dodawano 6 ml buforu ELISA
- koniugatu acetylocholinoesterazy z 8-OH-dG (AChE znacznik - liofilizat), do którego przed użyciem dodawano 6 ml buforu ELISA
- roztworu standardu o wyjściowym stężeniu 300 ng/ml, który posłużył do przygotowania wzorców o stężeniach od 10,3 do 3000 pg/ml niezbędnych do wykonania krzywej wzorcowej
- ELISA buforu, który przed użyciem rozcieńczano 10 krotnie wodą ultra czystą
- buforu płuczającego, który przed użyciem rozcieńczano 400 krotnie wodą ultra czystą
- 96 dołkowej płytki opłaszczanej kozim, poliklonalnym przeciwciałem przeciw mysiej IgG
- odczynnika Ellmana

Zasada metody

Metoda oparta jest na współzawodnictwie pomiędzy utlenionymi metabolitami guaniny pochodzącymi z badanej próby, a koniugatem 8-OH-dG-acetylocholinesterazy, który pełni rolę znacznika, o ograniczoną ilość przeciwciał monoklonalnych uszkadzających DNA/RNA.

Ponieważ ilość znacznika jest utrzymywana na stałym poziomie, a stężenie uszkodzonej przez utlenianie guaniny zmienia się, ilość znacznika, która jest w stanie związać się z przeciwciałem monoklonalnym, będzie odwrotnie proporcjonalna do stężenia guaniny uszkodzonej przez utlenianie.

Wykonanie oznaczenia:

- ❑ do odpowiednich dołków mikro płytki dodano po 50 µl roztworów wzorcowych oraz prób badanych
 - ❑ następnie dodano po 50 µl AChE znacznika i przeciwciała monoklonalnego do wszystkich dołków z wyjątkiem blanku
 - ❑ mikro płytkę przykryto folią i inkubowano przez 18 godzin w 4 °C
 - ❑ po inkubacji opróżniono dołki i płukano je pięciokrotnie buforem płuczającym
 - ❑ następnie do każdego dołka dodano 200 µl odczynnika Ellmana i po upływie 90 -120 minut odczytano absorbancję (Abs) wzorców i prób badanych na czytniku mikro płytek przy $\lambda = 412 \text{ nm}$
 - ❑ przy użyciu programu komputerowego sporządzono krzywą wzorcową (4P), z której odczytano stężenie utlenionych metabolitów guaniny (pg/ml) w badanych próbkach
- Stężenie utlenionych metabolitów guaniny w tkance żuchwy wyrażono w pg/mg białka. Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności CV była <2%.

Oznaczanie stężenia białek karbonylowych (PC)

Stężenie PC oznaczono przy użyciu zestawu Protein Carbonyl Assay Kit (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA) składającego się z:

- ❑ kwasu solnego 12 M, który przed użyciem rozcieńczano wodą ultra czystą uzyskując 2,5M HCl

- ❑ 2,4-dinitrofenylhydrazyny (DNPH), którą przed użyciem rozpuszczano w 2,5M HCl
- ❑ kwasu trichlorooctowego (TCA), z którego sporządzano roztwór 20 i 10%
- ❑ alkoholu etylowego
- ❑ octanu etylu
- ❑ chlorowodoru guanidyny
- ❑ płytki 96 dołkowej

Zasada metody

Metoda oparta jest na reakcji addycji PC do 2,4 dinitrofenylhydrazyny (DNPH). Powstający barwny produkt reakcji (2,4 dinitrofenylhydrazon) wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 360 - 385\text{nm}$.

Wykonanie oznaczenia:

- ❑ do odpowiednich probówek dodano po 100 μl badanej próby i po 400 μl DNPH
- ❑ próbki inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 4 godziny mieszając co 15 minut każdą próbkę
- ❑ następnie do każdej z prób dodano po 500 μl 20% TCA, zamieszano, umieszczono w lodzie i inkubowano przez 5 minut
- ❑ próbki odwirowano 10 000 x g przez 10 minut w 4 °C, nadsącz odrzucono, a osad zawieszono w 500 μl 10% TCA, po czym umieszczono w lodzie na 5 minut
- ❑ próbki odwirowano 10 000 x g przez 10 minut w 4 °C, nadsącz odrzucono, a osad zawieszono w 500 μl mieszaniny alkohol etylowy : octan etylu (1:1)
- ❑ osad dokładnie wymieszano, a następnie odwirowano 10 000 x g przez 10 minut w 4 °C,
- ❑ płukanie osadu mieszaniną alkohol etylowy : octan etylu (1:1) powtórzono jeszcze dwukrotnie
- ❑ po ostatnim płukaniu osad białka zawieszono w 250 μl chlorowodoru guanidyny
- ❑ próbki odwirowano 10 000 x g przez 10 minut w 4 °C
- ❑ z każdej próby przeniesiono 110 μl nadsącza do odpowiedniego dołka mikropłytki i zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 370\text{ nm}$ wobec blanku (2,5M HCl) przy użyciu czytnika mikropłytek

Stężenie PC obliczono z poniższego wzoru:

$$PC(\text{nmol/ml}) = [\text{ABS}/0,011\mu\text{M}^{-1}] \times 2,5$$

gdzie: *ABS* – wartość absorbancji

$0,011\mu\text{M}^{-1}$ – współczynnik ekstynkcji dla DNPH

Stężenie PC w tkance żuchwy wyrażono w nmol/mg białka.

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności CV była <4%.

Oznaczanie stężenia LPO

Stężenie LPO oznaczono przy użyciu zestawu Bioxytech®LPO-586™ firmy OxisResearch™ division of AOXRE LLC, (Burlingame, CA, USA), który składał się z:

- ❑ N-metylo-2-fenylindolu w acetonitrylu (R1), który przed użyciem rozcieńczono poprzez dodanie do 3 objętości tego roztworu 1 objętości rozpuszczalnika
- ❑ rozpuszczalnika (jony żelaza (III) w alkoholu metylowym)
- ❑ kwasu metanosulfonowego (MSA) (R2)
- ❑ TMOP (1,1,3,3-tetrametoksypropan) - wzorca MDA o stężeniu 10 mM w buforze Tris-HCl, który przed użyciem rozcieńczono wodą ultra czystą w stosunku 1:500 uzyskując roztwór o stężeniu 20 μM ; roztwór ten posłużył do przygotowania wzorców o stężeniach od 0 do 4 μM , niezbędnych do wykonania krzywej wzorcowej

Zasada metody

Metoda oparta jest na reakcji barwnej MDA i 4-HNE z chromogenem (N-metylo-2-fenylindol w acetonitrylu) w temp. 45°C. Barwny produkt wytworzony podczas reakcji wykazuje maksimum absorpcji przy $\lambda = 586 \text{ nm}$.

Wykonanie oznaczenia:

- ❑ do odpowiednich probówek dodano po 50 μl roztworów wzorcowych oraz prób badanych oraz po 162,5 μl rozcieńczonego R1 i wymieszano
- ❑ następnie do wszystkich probówek dodano po 37,5 μl R2 i po dokładnym wymieszaniu inkubowano w temp. 45°C przez 60 min.
- ❑ mierzono absorbancję wzorców i prób badanych przy $\lambda = 586 \text{ nm}$.

- przy pomocy programu komputerowego sporządzono krzywą wzorcową, z której automatycznie odczytano stężenie LPO

Stężenie LPO w tkance żuchwy wyrażono w nmol/mg białka.

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności CV była < 5%.

Oznaczanie stężenia nadtlenu wodoru (H₂O₂)

Stężenie H₂O₂ w homogenatach kości żuchwy oznaczono przy użyciu zestawu Bioxytech® H₂O₂-560™ firmy OxisResearch™ division of AOXRE LLC, (Burlingame, CA, USA), który składał się z:

- roztworu R1 – 25 mM siarczanu żelazowo(II)amonnego w 2.5M kwasie siarkowym
- roztworu R2 – 100 mM sorbitolu zawierającego 125 mM oranż ksylenolowy
- 25 mM roztworu H₂O₂ – roztwór wzorcowy

Zasada metody

Stężenie H₂O₂ oznaczono metodą spektrofotometryczną opartą na reakcji utleniania jonów Fe²⁺ do Fe³⁺. Powstałe jony Fe³⁺ wiążą się z oranżem ksylenolowym tworząc trwały barwny kompleks, którego intensywność, mierzona przy λ = 580 nm, jest wprost proporcjonalna do stężenia H₂O₂ w badanej próbce.

Wykonanie oznaczenia:

- przygotowano roztwory wzorcowe H₂O₂ w zakresie stężeń 0 - 100 μM
- do odpowiednich probówek dodano 1 objętość próby lub wzorca i 10 objętości roztworu roboczego przygotowanego poprzez zmieszanie w stosunku 1:100 roztworów R1 i R2
- po dokładnym wymieszaniu mierzono absorbancję wzorców i prób badanych przy λ = 560 nm.
- przy pomocy programu komputerowego sporządzono krzywą wzorcową, z której automatycznie odczytano stężenie H₂O₂

Stężenie H₂O₂ w homogenatach żuchwy wyrażono w nmol/mg białka.

Precyzja metody wyrażona jako współczynnik zmienności CV była < 2%.

Oznaczanie całkowitego potencjału oksydacyjnego (TOS)

Stężenie TOS oznaczono przy użyciu zestawu PerOx (TOS) Kit firmy Immundiagnostik AG (Bensheim, Niemcy) zawierającego:

- kalibrator (CAL) o stężeniu 376 $\mu\text{mol/l}$ (лиофилizat, do którego przed użyciem dodano 250 μl roztworu do rozpuszczania)
- próby kontrolne (CTRL) (лиофилizaty, do których przed użyciem dodano po 250 μl roztworu do rozpuszczania) o stężeniach:
 - CTRL 1 116 – 194 $\mu\text{mol/l}$
 - CTRL 2 423 – 705 $\mu\text{mol/l}$
- bufor reakcyjny A (REFBUF A) i (REFBUF B) B
- roztwór enzymu (ENZ)
- roztwór do rozpuszczania (RECSOL)
- roztwór stop (STOP)
- płytki 96 dołkowa

Zasada metody

Metoda oparta jest na reakcji peroksydazy z nadtlenkami podczas której dochodzi do przemiany 1,3,5-trimetylobenzenu (TMB) do barwnego produktu, którego intensywność jest mierzona fotometrycznie przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Wykonanie oznaczenia

Przed przeprowadzeniem analizy przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z:

- 10 ml buforu reakcyjnego A
 - 200 μl buforu reakcyjnego B
 - 10 μl roztworu enzymu
- do odpowiednich dołków mikropłytki dodano po 10 μl próbek badanych, kalibratora i próbek kontrolnych oraz odpipetowano po 100 μl buforu reakcyjnego A i po wymieszaniu odczytano absorbancję (Abs 1) przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$.
 - następnie dodano po 100 μl przygotowanej mieszaniny reakcyjnej i inkubowano płytkę przez 15 min. w 37°C.
 - po inkubacji dodano 50 μl stop roztworu i ponownie zmierzono absorbancję (Abs 2)

Stężenie TOS obliczono ze wzoru:

$$TOS (\mu\text{mol/l}) = \frac{(Abs\ 2\ próby - Abs\ 1\ próby)}{(Abs\ 2\ CAL - Abs\ 1\ CAL)} \times 376$$

Stężenie TOS w tkance żuchwy wyrażono w nmol/mg białka.

Wartości TOS oznaczone w próbkach kontrolnych znajdujących się w zestawie wynosiły odpowiednio $173,4 \pm 3,150$ i $661,7 \pm 28,70$ $\mu\text{mol/l}$ (średnia \pm SE, $n = 2$) i mieściły się w zakresach podanych przez producenta. Precyzja metody wyrażona jako CV była $< 3\%$.

Oznaczanie stężenia białka w homogenatach

Celem wyrażenia badanych wskaźników stanu oksydacyjno-redukcyjnego w przeliczeniu na mg białka w homogenatach żuchwy oznaczono stężenie białka całkowitego zestawem diagnostycznym firmy BioMaxima zgodnie z instrukcją producenta.

4.4 Analiza statystyczna wyników badań

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu komputerowego Statistica 13 (StatSoft; Tulsa, USA).

Ponieważ test Shapiro –Wilka wykazał brak rozkładu normalnego danych w celu oceny znamienności statystycznej różnic między grupami doświadczalnymi przeprowadzono nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Wyniki przedstawiono w postaci mediany oraz zakresu stężeń (minimum – maksimum) dla 8 szczurów w każdej z grup.

Przeprowadzono także analizę korelacji Pearsona między stężeniem Cd i Zn a ocenianymi wskaźnikami stanu oksydacyjno-redukcyjnego w tkance kostnej żuchwy.

Różnice między grupami i korelacje pomiędzy zmiennymi uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

V. Wyniki

5.1 Stężenie Zn i Cd w tkance kostnej zuchwy

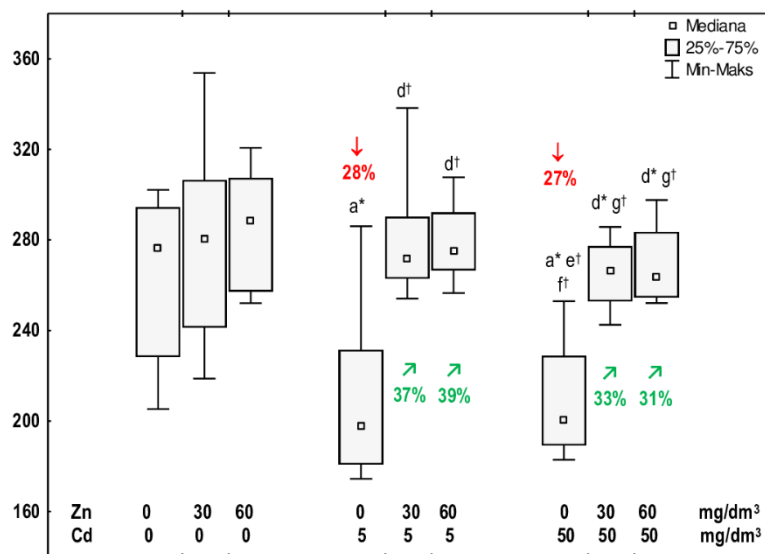
Wyniki oznaczeń stężeń Zn i Cd w tkance kostnej zuchwy u zwierząt ze wszystkich grup doświadczalnych przedstawiono w Tabeli I i na Rycinach 7, 8.

Tabela I. Wpływ kadmu i/lub cynku na stężenie tych metali w tkance kostnej zuchwy.

	Zn µg/g	Cd µg/g
kontrola	276.3 205.3 – 302.1	0,0094 0.0058 – 0.0130
30 mg Zn/dm ³	280.7 218.8 – 353.8	0.0094 0.0072 – 0.0110
60 mg Zn/dm ³	288.3 252.1 – 320.7	0.0084 0.0054 – 0.0251
5 mg Cd/dm ³	197.7 a* 174.5 – 286.1	0.1441 a [†] b [†] c [†] 0.1203 – 0.2825
5 mg Cd/dm ³ + 30 mg Zn/dm ³	271.5 d [†] 254.1 – 338.3	0.0505 a* b* c* d* 0.0401 – 0.0722
5 mg Cd/dm ³ + 60 mg Zn/dm ³	275.0 d [†] 256.5 – 307.7	0.0608 a* b* c* d* 0.0453 – 0.0886
50 mg Cd/dm ³	200.5 a*e [‡] f [†] 182.9 – 252.9	0.3795 a [‡] b [‡] c [‡] d [‡] e [†] f [‡] 0.2463 – 0.5309
50 mg Cd/dm ³ + 30 mg Zn/dm ³	266.3 d*g [†] 242.5 – 285.8	0.2088 a [‡] b [‡] c [‡] e* f* g [†] 0.1101 – 0.2463
50 mg Cd/dm ³ + 60 mg Zn/dm ³	263.6 d* g [†] 252.1 – 297.6	0.2443 a [‡] b [‡] c [‡] d [†] e [†] f [†] g [†] 0.2000 – 0.3612

Wartości przedstawiają medianę oraz zakres stężeń (minimum – maksimum) dla 8 zwierząt w grupie.

*p < 0,05; [†]p < 0,01; [‡]p < 0,001 względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.



* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

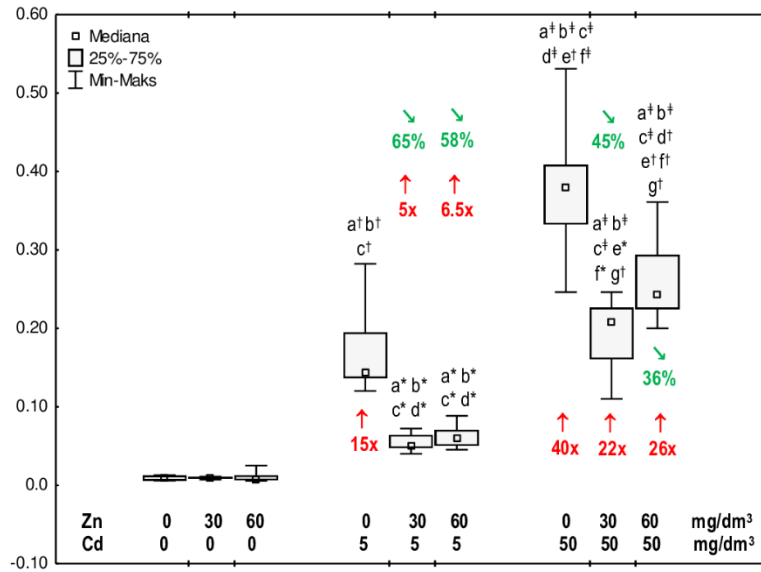
↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej; ↗ wzrost w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 7. Stężenie cynku ($\mu\text{g/g}$ tkanki) w tkance kostnej żuchwy szczurów.

Stężenie Zn w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiło 276.3 $\mu\text{g/g}$ tkanki. U zwierząt otrzymujących 30 lub 60 mg Zn/dm³ przez 12 miesięcy stężenie tego metalu było na poziomie grupy kontrolnej i wynosiło odpowiednio 280.7 i 288.3 $\mu\text{g/g}$ tkanki.

Narażanie szczurów na kadm w stężeniu 5 mg/dm³ prowadziło do obniżenia stężenia cynku w badanej tkance o 28% względem grupy kontrolnej. U zwierząt, którym przez cały okres narażenia na 5 mg Cd/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ stężenie Zn było wyższe odpowiednio o 37 i 39% w stosunku do grupy, której podczas ekspozycji na ten ksenobiotyk nie podawano cynku i nie różniło się od stężenia tego biopierwiastka w grupie kontrolnej.

Narażenie na kadm w stężeniu 50 mg/dm³ przez 12 miesięcy prowadziło do obniżenia stężenia cynku o 27% względem grupy kontrolnej. Natomiast w grupach szczurów otrzymujących 30 lub 60 mg Zn/dm³ przez cały okres ekspozycji na 50 mg Cd/dm³ stężenie Zn było wyższe odpowiednio o 33% i 31% w stosunku do grupy, której podczas ekspozycji na ten ksenobiotyk nie podawano cynku i nie różniło się od stężenia tego biopierwiastka w grupie kontrolnej.



*p < 0,05; †p < 0,01; ‡p < 0,001; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

↑ wzrost w stosunku do grupy kontrolnej; ↓ obniżenie w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 8. Stężenie kadmu (µg/g tkanki) w tkance kostnej żuchwy szczurów.

Stężenie Cd w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiło 0,0094 µg/g tkanki. U zwierząt otrzymujących 30 lub 60 mg Zn/dm³ przez 12 miesięcy stężenie tego metalu było na poziomie grupy kontrolnej i wynosiło odpowiednio 0.0094 i 0.0084 µg/g tkanki.

Narażanie szczurów na 5 mg Cd/dm³ prowadziło do 15-krotnego wzrostu stężenia tego metalu w tkance kostnej żuchwy względem grupy kontrolnej. W grupach szczurów, którym przez cały okres ekspozycji na kadm w stężeniu 5 mg/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ stężenie Cd było niższe odpowiednio o 65 i 58% w stosunku do grupy, której podczas ekspozycji na ten ksenobiotyk nie podawano cynku i wyższe niż w grupie kontrolnej odpowiednio 5.4– i 6.5– krotnie.

Narażenie na kadm w stężeniu 50 mg/dm³ przez 12 miesięcy spowodowało znaczny, bo aż 40-krotny wzrost stężenia tego metalu w badanej tkance względem grupy kontrolnej. W grupach zwierząt, którym przez cały okres ekspozycji na kadm w stężeniu 50 mg/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ stężenie Cd było niższe odpowiednio o 45 i 36% w stosunku do grupy, której podczas ekspozycji na ten ksenobiotyk nie podawano cynku i wyższe niż w grupie kontrolnej odpowiednio 22– i 26– krotnie.

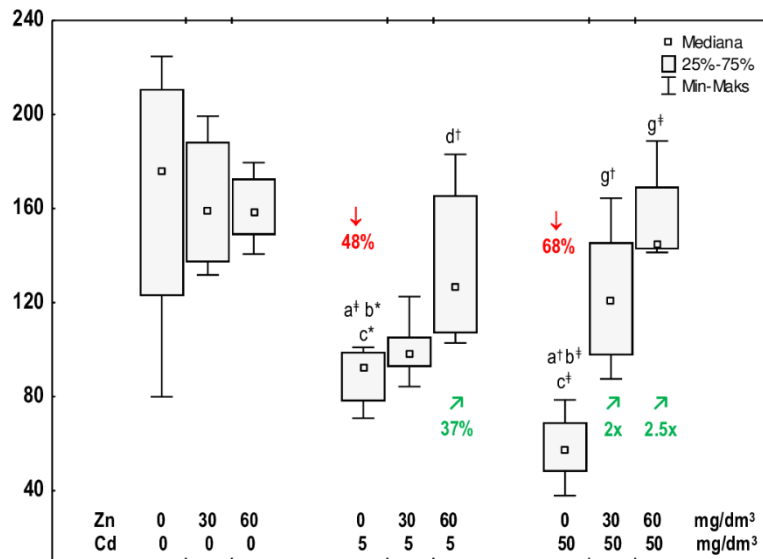
5.2 Wpływ Zn na enzymatyczną barierę antyoksydacyjną w tkance kostnej żuchwy szczurów narażanych na kadm.

Wyniki oznaczeń aktywności SOD, CAT, GPx i GR w tkance kostnej żuchwy u zwierząt ze wszystkich grup doświadczalnych przedstawiono w Tabeli II i na Rycinach 9 - 12. Tabela II. Wpływ kadmu i/lub cynku na aktywność SOD, CAT, GPx i GR w tkance kostnej żuchwy.

	GPx mU/mg protein	SOD U/mg protein	CAT mmol H ₂ O ₂ /min/ mg protein	GR mU/mg protein
Kontrola	175.9 79.88 – 224.7	10.02 7.670 – 11.62	4.098 3.475 – 7.489	13.79 10.79 – 28.39
30 mg Zn/dm³	159.2 131.7 – 199.3	8.726 7.673 – 10.06	7.514 6.302 – 10.95	15.10 11.96 – 32.27
60 mg Zn/dm³	158.3 140.6 – 179.6	8.822 7.812 – 10.61	6.563 5.529 – 9.606	8.487 a* 5.310 – 10.14
5 mg Cd/dm³	92.09 a [†] b* c* 70.80 – 100.9	6.711 a* 6.149 – 7.556	3.822 3.132 – 5.621	18.60 c [‡] 17.25 – 20.46
5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³	97.93 84.30 – 122.5	5.911 a [†] 5.022 – 7.726	14.58 a [†] d [†] 9.055 – 17.34	6.890 a [†] d [†] 4.812 – 10.75
5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³	126.6 d* 102.8 – 183.0	9.193 d* 6.110 - 10.78	16.03 a [†] d [†] 14.49 – 19.64	6.554 a [†] d [†] 5.377 – 8.577
50 mg Cd/dm³	57.14 a [†] b [‡] c [‡] 37.90 – 78.60	5.380 a [†] 4.435 – 9.427	1.506 a* e [†] f [‡] 1.147 – 2.692	20.16 c [‡] e [†] f [‡] 11.91 – 25.91
50 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³	121.2 g [†] 87.50 – 164.4	9.786 g [†] 6.230 – 10.57	16.35 a [†] d [†] g [‡] 11.65 – 19.08	17.39 c* e [†] f* 13.33 – 20.00
50 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³	144.8 g [‡] 141.3 – 188.7	9.763 e [†] g [‡] 8.446 – 13.96	18.57 a [†] d [†] g [‡] 17.05 – 20.60	16.88 c* e [†] f* 14.43 – 18.64

Wartości przedstawiają medianę oraz zakres stężeń (minimum – maksimum) dla 8 zwierząt w grupie.

*p < 0,05; [†]p < 0,01; [‡]p < 0,001; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.



*p < 0,05; †p < 0,01; ‡p < 0,001; względem ^akontrolni, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej; ↗ wzrost w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

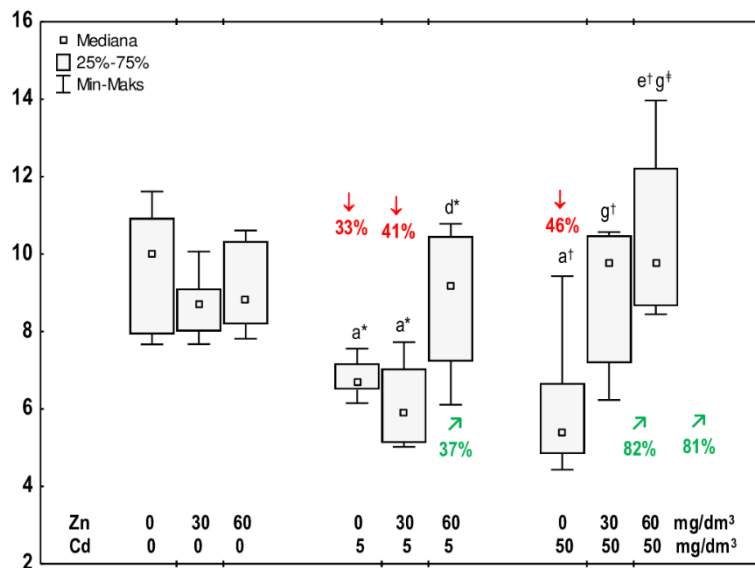
Rycina 9. Aktywność GPx (mU/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.

Aktywność GPx w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiła 175,9 mU/mg białka. Podawanie zwierzętom cynku w obu stężeniach nie miało wpływu na aktywność tego enzymu.

Narażanie szczurów na 5 lub 50 mg Cd/dm³ prowadziło do obniżenia aktywności GPx odpowiednio o 48% i 68% w stosunku do grupy kontrolnej.

W grupie zwierząt, którym przez cały okres ekspozycji na 5 mg Cd/dm³ podawano 30 mg Zn/dm³ aktywność GPx nie różniła się w stosunku do grupy szczurów, którym nie podawano tego biopierwiastka podczas narażenia na kadm i nie różniła się względem grupy kontrolnej. Natomiast suplementacja cynkiem w stężeniu 60 mg Zn/dm³ podczas ekspozycji na kadm (grupa 5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³) prowadziła do wzrostu aktywności GPx o 37% w porównaniu do grupy, której nie podawano cynku (grupa 5 mg Cd/dm³) i nie różniła się względem szczurów kontrolnych.

W grupie zwierząt, którym przez cały okres ekspozycji na 50 mg Cd/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ aktywność GPx w tkance kostnej żuchwy była wyższa w porównaniu do grupy, w której nie zastosowano suplementacji cynkiem odpowiednio 2-krotnie oraz 2,5-krotnie i nie różniła się względem grupy kontrolnej.



* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

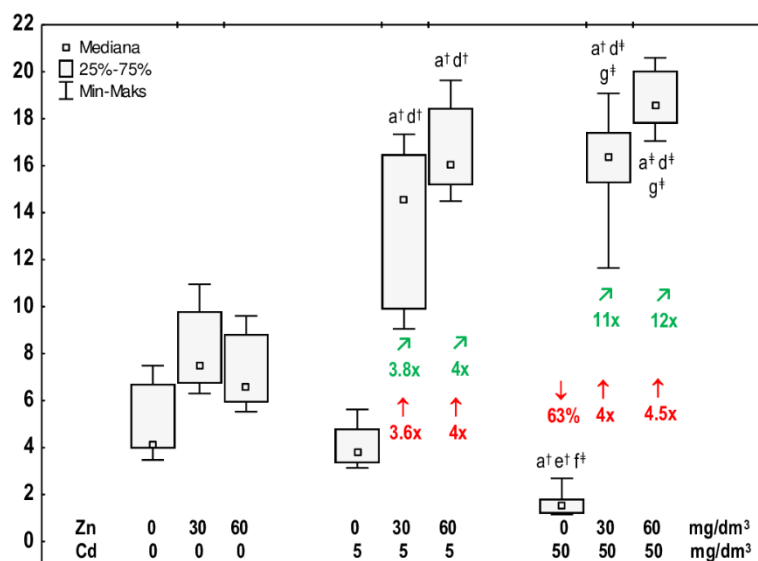
↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej; ↗ wzrost w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 10. Aktywność SOD (U/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.

Aktywność SOD w tkance kostnej żuchwy szczurów z grupy kontrolnej wynosiła 10,02 U/mg białka. Podawanie zwierzętom cynku w obu stężeniach nie miało wpływu na aktywność tego enzymu.

Narażanie szczurów na 5 lub 50 mg Cd/dm³ prowadziło do obniżenia aktywności SOD odpowiednio o 33% i 46% względem grupy kontrolnej. W grupie zwierząt, którym przez cały okres ekspozycji na 5 mg Cd/dm³ podawano 30 mg Zn/dm³ aktywność SOD nie różniła się w porównaniu do grupy, w której nie zastosowano suplementacji cynkiem i była o 41% niższa niż w grupie kontrolnej. Natomiast w grupie szczurów otrzymujących 5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³ aktywność SOD była wyższa o 37% w stosunku do grupy zwierząt, którym nie podawano cynku i pozostawała na poziomie grupy kontrolnej.

Także w grupach zwierząt, którym przez cały okres ekspozycji na kadm w stężeniu 50 mg/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ aktywność SOD była wyższa w porównaniu do grupy, w której nie zastosowano suplementacji cynkiem odpowiednio o 82% i 81% i pozostawała na poziomie grupy kontrolnej.



*p < 0,05; †p < 0,01; ‡p < 0,001; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

↑ wzrost lub ↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej; ↗ wzrost w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

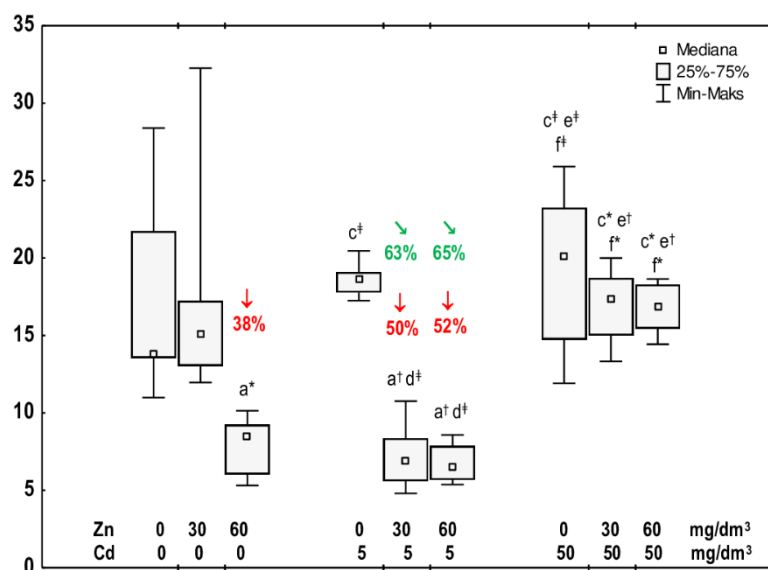
Rycina 11. Aktywność CAT (mmol H₂O₂/min/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.

Aktywność CAT w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiła 4.098 mmol H₂O₂/min/mg białka. Podawanie szczurom cynku nie wpływało na aktywność tego enzymu

Ekspozycja zwierząt na kadm jedynie w stężeniu 50 mg/dm³ prowadziła do obniżenia aktywności CAT w tkance kostnej żuchwy o 63% względem grupy kontrolnej.

W grupie szczurów, którym przez cały okres ekspozycji na 5 mg Cd/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ aktywność CAT była wyższa w porównaniu do grupy, w której nie zastosowano suplementacji cynkiem odpowiednio 3.8-krotnie oraz 4-krotnie i była wyższa niż w grupie kontrolnej odpowiednio 3.6-krotnie oraz 4-krotnie.

Także w grupie szczurów, którym przez cały okres ekspozycji na 50 mg Cd/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ aktywność CAT była wyższa w porównaniu do grupy, w której nie zastosowano suplementacji tym biopierwiastkiem odpowiednio 11-krotnie oraz 12-krotnie i wyższa niż w grupie kontrolnej odpowiednio 4-krotnie oraz 4.5-krotnie.



* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³.

↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej; ↘ obniżenie w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 12. Aktywność GR (mU/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.

Aktywność GR w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiła 13.79 mU/mg białka. Podawanie szczurom 60 mg Zn/dm³ prowadziło do obniżenia aktywności tego enzymu o 38% względem grupy kontrolnej.

Ekspozycja zwierząt na 5 i 50 mg mCd/dm³ nie miała wpływu na aktywność GR.

W grupie szczurów, którym przez cały okres ekspozycji na 5 mg Cd/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ aktywność GR była niższa w porównaniu do grupy, w której nie zastosowano cynku odpowiednio o 63% oraz o 65% oraz niższa niż w grupie kontrolnej odpowiednio 50% oraz 52%.

Natomiast w grupie szczurów, którym przez cały okres ekspozycji na 50 mg Cd/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ aktywność GR nie różniła się w porównaniu do grupy, w której nie zastosowano suplementacji tym biopierwiastkiem i pozostawała na poziomie grupy kontrolnej.

5.3 Wpływ Zn na oksydacyjne wskaźniki stresu w tkance kostnej żuchwy szczurów narażonych na kadm.

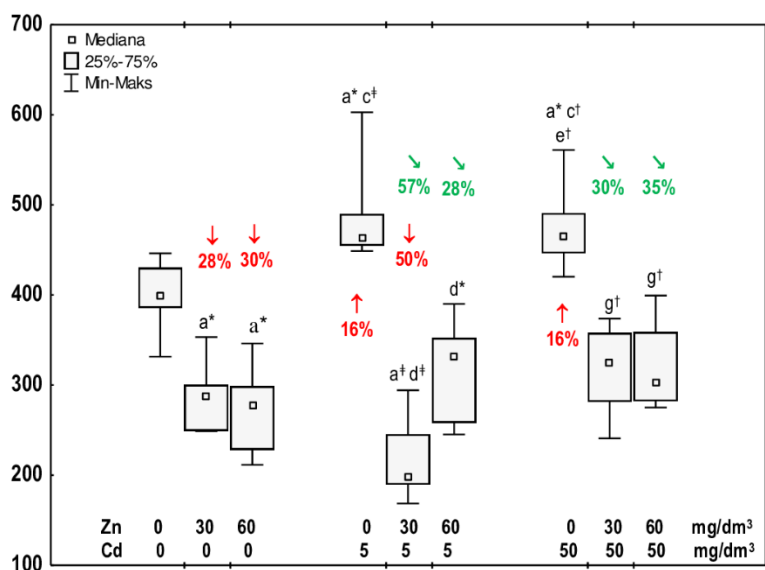
Wyniki oznaczeń DNA/RNA, PC, LPO i H₂O₂ w tkance kostnej żuchwy u zwierząt ze wszystkich grup doświadczalnych przedstawiono w Tabeli III i na Rycinach 13 - 16.

Tabela III. Wpływ kadmu i/lub cynku na stężenie DNA/RNA, PC, LPO i H₂O₂ w tkance kostnej żuchwy.

	DNA/RNA pg/mg białka	PC nmol/mg białka	LPO μM/g białka	H₂O₂ nmol/mg białka
Kontrola	399.2 331.6 – 446.3	31.30 25.86 – 46.30	4.973 4.131 – 6.480	128.6 105.9 – 150.4
30 mg Zn/dm ³	287.4 a* 248.9 – 353.4	32.84 24.62 – 42.69	4.293 3.685 – 7.093	91.27 a* 76.52 – 157.8
60 mg Zn/dm ³	277.3 a* 211.5 – 346.2	32.29 24.28 – 42.17	4.010 a* 2.886 – 5.071	86.83 a† 64.37 – 106.1
5 mg Cd/dm ³	464.0 a* c‡ 448.8 – 602.8	111.2 a‡ b‡ c‡ 87.97 – 129.0	8.100 a‡ b† c‡ 7.781 – 12.06	141.3 c† 136.7 – 182.7
5 mg Cd/dm ³ + 30 mg Zn/dm ³	199.1 a† d‡ 168.6 – 294.3	23.25 d‡ 20.61 – 38.05	2.599 a† d‡ 2.307 – 4.687	60.85 a‡ d‡ 51.44 – 87.23
5 mg Cd/dm ³ + 60 mg Zn/dm ³	332.4 d* 245.2 – 390.1	35.08 d† 32.38 – 45.42	4.832 d‡ 3.737 – 5.672	101.7 d† 76.23 – 116.7
50 mg Cd/dm ³	464.6 a*c† e‡ 420.3 – 561.0	107.5 a‡ b‡ c‡ e‡ 103.2 – 123.1	7.206 a† b* c‡ e‡ 5.884 – 12.81	273.8 a† b*c‡ e‡ f* 201.8 – 306.7
50 mg Cd/dm ³ + 30 mg Zn/dm ³	325.2 g† 240.8 – 373.8	27.09 d‡ f† g‡ 21.98 – 30.32	4.668 d† g‡ 3.350 – 5.821	98.94 g† 73.55 – 107.6
50 mg Cd/dm ³ + 60 mg Zn/dm ³	303.6 g† 275.2 – 399.4	30.07 d† g‡ 22.19 – 35.65	4.479 d† g† 3.691 – 6.011	92.37 g† 83.60 – 108.1

Wartości przedstawiają medianę oraz zakres stężeń (minimum – maksimum) dla 8 zwierząt w grupie.

*p < 0,05; †p < 0,01; ‡p < 0,001; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.



* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

↑ wzrost lub ↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej; ↘ obniżenie w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

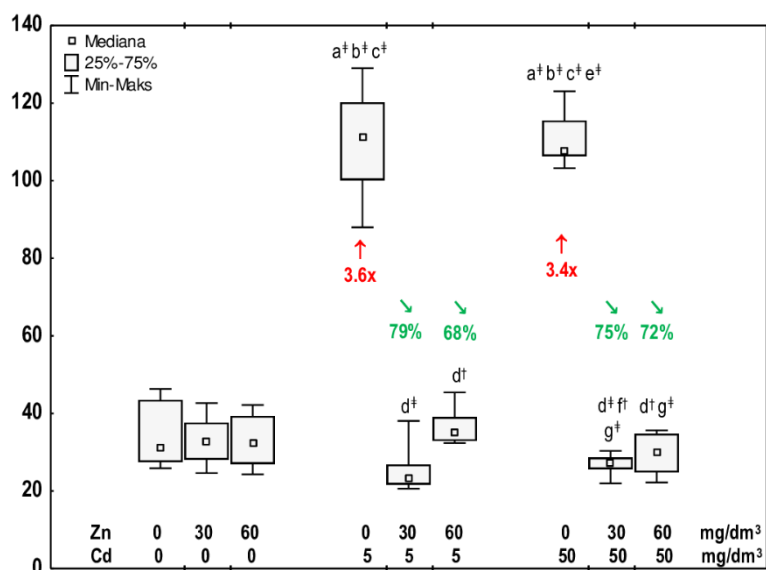
Rycina 13. Stężenie DNA/RNA (pg/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.

Stężenie DNA/RNA w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiło 399.2 pg/mg białka. U zwierząt, którym przez 12 miesięcy podawano cynk w stężeniu 30 i 60 mg/dm³ wartość tego parametru obniżyła się w porównaniu do grupy kontrolnej odpowiednio o 28% i 30%.

Narażenie na kadm w stężeniu 5 mg/dm³ spowodowało 16% wzrost DNA/RNA w tkance kostnej żuchwy względem grupy kontrolnej. W grupie zwierząt, której w czasie narażenia na kadm podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ (grupa 5 mg Cd/dm³ + 30 i/lub 60 mg Zn/dm³) stężenie DNA/RNA było niższe względem grupy, której nie podawano cynku podczas narażenia na ten ksenobiotyk odpowiednio o 57% oraz 28% i niższe względem grupy kontrolnej o 50% jedynie u szczurów otrzymujących 5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³.

Ekspozycja szczurów na kadm w stężeniu 50 mg/dm³ spowodowała 16% wzrost DNA/RNA w tkance kostnej żuchwy względem grupy kontrolnej.

U szczurów otrzymujących 30 lub 60 mg Zn/dm³ przez cały okres narażenia na kadm DNA/RNA było niższe względem grupy, której nie podawano cynku w czasie narażenia na ten ksenobiotyk odpowiednio o 30% oraz 35% i pozostawało na poziomie grupy kontrolnej.



* $p < 0,05$; [†] $p < 0,01$; [‡] $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

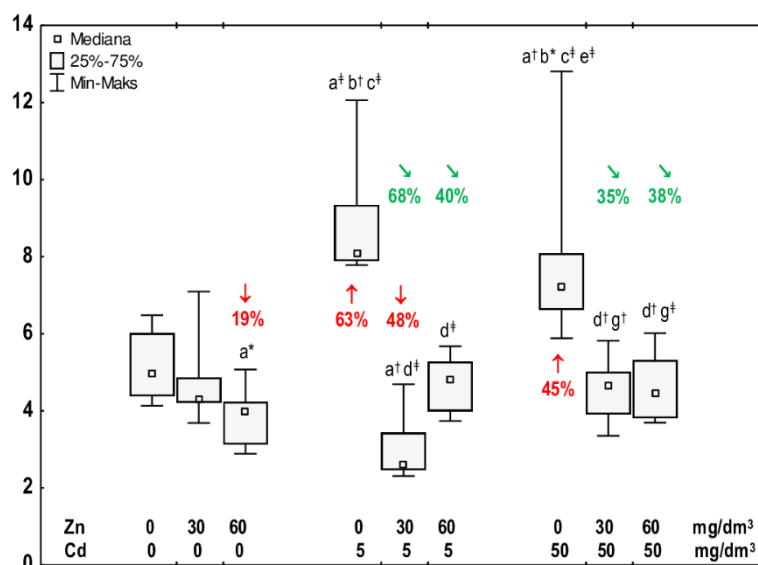
↑ wzrost w stosunku do grupy kontrolnej; ↓ obniżenie w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 14. Stężenie PC (nmol/mg białka) w tkance kostnej zuchwy szczurów.

Stężenie PC w tkance kostnej zuchwy szczurów kontrolnych wynosiło 31.30 nmol/mg białka. U zwierząt, którym przez 12 miesięcy podawano cynk w stężeniu 30 i 60 mg/dm³ wartość tego parametru nie różniła się w porównaniu do grupy kontrolnej.

Narażenie na kadm w stężeniu 5 mg/dm³ spowodowało znaczny, bo aż 3.6-krotny wzrost PC względem grupy kontrolnej. W grupie szczurów, którym podczas ekspozycji na kadm podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ stężenie PC było niższe względem grupy, której nie podawano cynku podczas narażenia na ten ksenobiotyk odpowiednio o 79% oraz 68% i nie różniło się względem grupy kontrolnej.

Również ekspozycja na kadm w stężeniu 50 mg/dm³ spowodowała znaczny, bo aż 3.4-krotny wzrost PC względem grupy kontrolnej. U szczurów otrzymujących 30 lub 60 mg Zn/dm³ przez cały okres względnie wysokiego narażenia na kadm PC było niższe względem grupy, której nie podawano cynku w czasie narażenia na ten ksenobiotyk odpowiednio o 75% oraz 72% i nie różniło się względem grupy kontrolnej.



* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

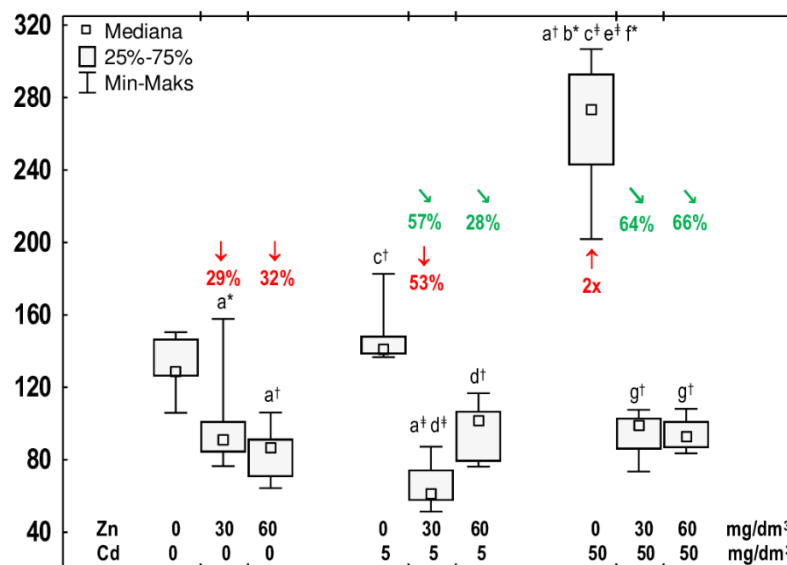
↑ wzrost lub ↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej; ↘ obniżenie w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 15. Stężenie LPO (µM/g białka) w tkance kostnej zuchwy szczurów.

Stężenie LPO w tkance kostnej zuchwy szczurów kontrolnych wynosiło 4.973 (µM/g białka). U zwierząt otrzymujących 30 mg Zn/dm³ stężenie LPO pozostawało na poziomie grupy kontrolnej, natomiast podawanie 60 mg Zn/dm³ skutkowało 19% obniżeniem LPO względem grupy kontrolnej.

Narażanie szczurów na 5 mg Cd/dm³ prowadziło do wzrostu stężenia LPO o 63% w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie zwierząt, którym przez cały okres ekspozycji na kadm w tym stężeniu podawano 30 mg Zn/dm³ stężenie LPO było niższe o 68% niż w grupie zwierząt narażanych tylko na kadm i niższe o 48% w stosunku do wartości odnotowanych w grupie kontrolnej. Natomiast u szczurów otrzymujących 60 mg Zn/dm³ podczas narażenia na ten metal LPO było niższe o 40% niż w grupie zwierząt, którym nie podawano cynku (grupa 5 mg Cd/dm³) i nie różniło się w stosunku do wartości odnotowanych w grupie kontrolnej.

Narażanie szczurów na 50 mg Cd/dm³ prowadziło do wzrostu LPO o 45% względem grupy kontrolnej. W grupach zwierząt, którym przez cały okres ekspozycji na 50 mg/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ LPO było niższe odpowiednio o 35% i 38% w stosunku do szczurów narażanych jedynie na kadm (grupa 50 mg Cd/dm³) i nie różniło się względem grupy kontrolnej.



* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

↑ wzrost lub ↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej; ↘ obniżenie w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 16. Stężenie H₂O₂ (nmol/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.

Stężenie H₂O₂ w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiło 128.6 nmol/mg białka. Podawanie zwierzętom cynku w stężeniu 30 lub 60 mg/dm³ skutkowało obniżeniem stężenia H₂O₂ odpowiednio o 29% i 32% względem grupy kontrolnej.

Narażanie szczurów na 5 mg Cd/dm³ nie miało wpływu na stężenie H₂O₂.

Natomiast w grupach zwierząt, którym podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ podczas narażenia na 5 mg Cd/dm³ stężenie H₂O₂ było niższe odpowiednio o 57% i 28% niż w grupie zwierząt, którym nie podawano cynku podczas narażenia na ten ksenobiotyku. Ponadto w grupie szczurów otrzymujących 5 mg Cd/dm³+30 mg Zn/dm³ stężenie H₂O₂ było niższe niż w grupie kontrolnej o 53%.

Narażanie szczurów na 50 mg Cd/dm³ prowadziło do 2-krotnego wzrostu H₂O₂ względem grupy kontrolnej. Natomiast w grupach szczurów, którym przez cały okres ekspozycji na kadm w tym stężeniu podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ stężenie H₂O₂ było niższe odpowiednio o 64% i 66% w stosunku do grupy zwierząt, którym nie podawano cynku podczas narażenia na ten metal i pozostawało na poziomie grupy kontrolnej.

5.4 Wpływ Zn na stężenie TOS, TAS oraz stosunek TOS/TAS (OSI) w tkance kostnej żuchwy szczurów narażanych na kadm.

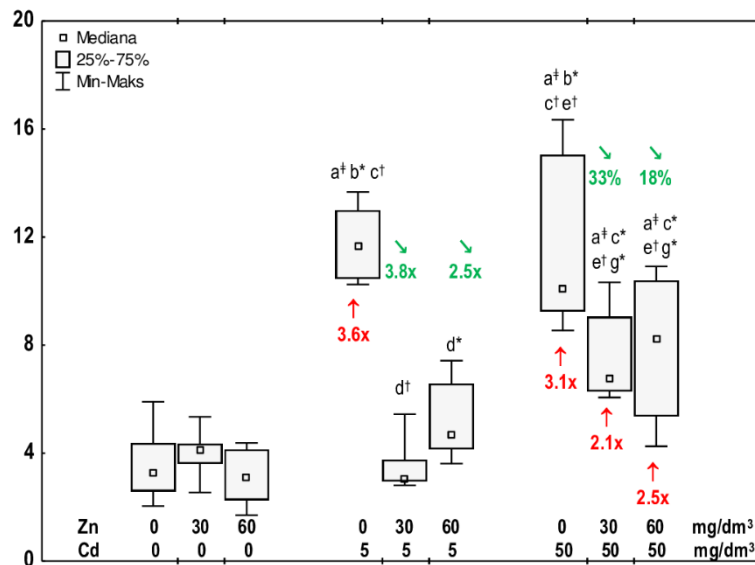
Wyniki oznaczeń TOS, TAS i OSI w tkance kostnej żuchwy u zwierząt ze wszystkich grup doświadczalnych przedstawiono w Tabeli IV i Rycinach 17 - 19

Tabela IV. Wpływ cynku i /lub kadmu na stężenie TOS, TAS i OSI w tkance kostnej żuchwy.

	TOS nmol/mg białka	TAS nmol/mg białka	OSI
Kontrola	3.252 2.040 – 5.901	428.5 368.4 – 504.3	0.0079 0.0054 - 0.0129
30 mg Zn/dm³	4.134 2.541 – 5.347	493.5 467.7 – 622.5	0.0082 0.0058 - 0.0101
60 mg Zn/dm³	3.123 1.704 – 4.379	498.4 322.6 – 521.6	0.0071 0.0036 - 0.0140
5 mg Cd/dm³	11.68 a [†] b* c [†] 10.24 – 13.67	242.3 a [†] b [‡] c [‡] 165.3 – 362.0	0.0462 a [†] b [‡] c [‡] 0.0237 - 0.0927
5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³	3.066 d [†] 2.805 – 5.440	401.6 d [†] 307.8 – 531.3	0.0042 d [‡] 0.0035 - 0.0171
5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³	4.692 d* 3.614 – 7.423	485.8 d [†] 329.2 – 571.4	0.0123 d [‡] 0.0042 - 0.0147
50 mg Cd/dm³	10.08 a [†] b*c [†] e [†] 8.541 – 16.34	180.8 a [†] b [‡] c [‡] f* 151.6 – 269.9	0.0573 a [†] b [‡] c [‡] e [‡] 0.0307 - 0.0915
50 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³	6.742 a [†] c* e [†] g* 6.058 – 10.32	646.0 a* d [‡] g [‡] 403.2 – 742.3	0.0115 g [‡] 0.0082 - 0.0250
50 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³	8.238 a [†] c* e [†] g* 4.251 – 10.92	660.3 a [†] d [‡] g [‡] 508.0 – 910.6	0.0117 g [‡] 0.0067 - 0.0203

Wartości przedstawiają medianę oraz zakres stężeń (minimum – maksimum) dla 8 zwierząt w grupie.

*p < 0,05; †p < 0,01; ‡p < 0,001; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f5 mg Cd/dm³ + 60 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.



* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^f50 mg Cd/dm³.

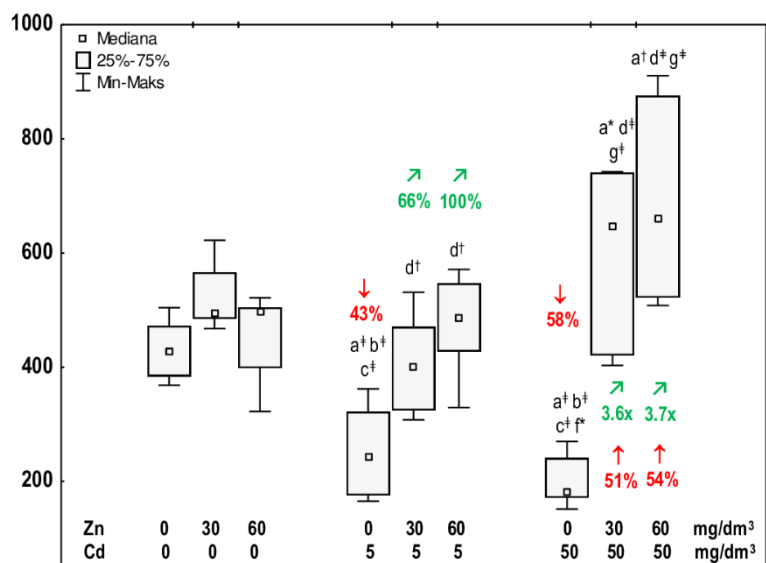
↑ wzrost w stosunku do grupy kontrolnej; ↓ obniżenie w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 17. Stężenie TOS (nmol/mg białka) w tkance kostnej żuchwy.

Stężenie TOS w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiło 3,252 nmol/mg białka. U zwierząt, którym przez 12 miesięcy podawano cynk w stężeniu 30 i 60 mg/dm³ wartość tego parametru osiągała odpowiednio 4,134 nmol/mg białka i 3,123 nmol/mg białka i nie różniła się w porównaniu do grupy kontrolnej.

Narażenie na kadm w stężeniu 5 mg/dm³ spowodowało znaczny, aż 3.6-krotny wzrost TOS w tkance kostnej żuchwy (11.68 nmol/mg białka) względem grupy kontrolnej. W grupie zwierząt, której w czasie narażenia na kadm w tym stężeniu podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ TOS był niższy odpowiednio 3.8-krotnie i 2.5-krotnie względem grupy otrzymującej 5 mg Cd/dm³ i nie różnił się względem grupy kontrolnej.

Ekspozycja szczurów na kadm w stężeniu 50 mg/dm³ spowodowała 3.1-krotny wzrost TOS w tkance kostnej żuchwy (10.08 nmol/mg białka) względem grupy kontrolnej. U szczurów otrzymujących 30 lub 60 mg Zn/dm³ przez cały okres narażenia na kadm TOS był niższy odpowiednio o 33% i 18% względem grupy otrzymującej 50 mg Cd/dm³ oraz wyższy, odpowiednio 2.1-krotnie i 2.5-krotnie niż w grupie kontrolnej.



*p < 0,05; †p < 0,01; ‡p < 0,001; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ +60 mg Zn/dm³, ^f50 mg Cd/dm³.

↑ wzrost; ↓ obniżenie w stosunku do grupy kontrolnej;

↗ wzrost w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 18. Stężenie TAS (nmol/mg białka) w tkance kostnej żuchwy.

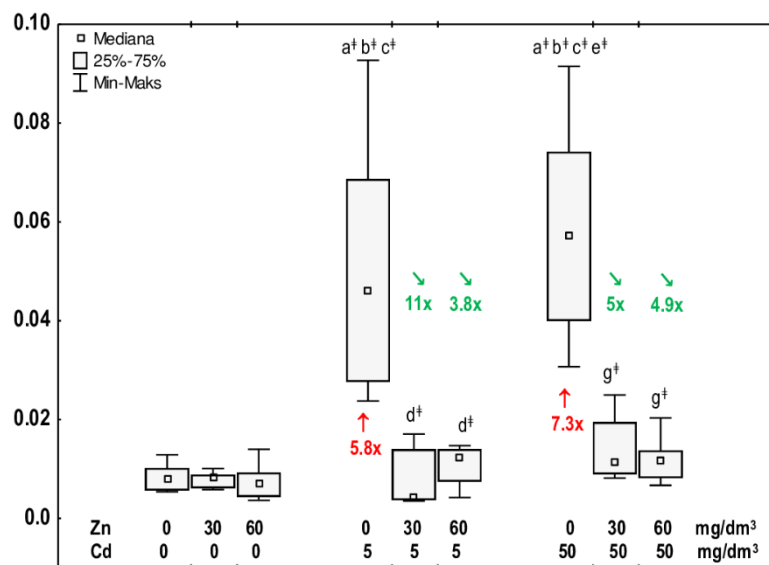
Stężenie TAS w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosiło 428.5 nmol/mg białka. U zwierząt, którym przez cały okres doświadczenia podawano cynk w stężeniu 30 mg/dm³ lub 60 mg Zn/dm³ TAS było na poziomie grupy kontrolnej i wynosiło odpowiednio 493.5 i 498.4 nmol/mg białka.

Narażenie szczurów na 5 i 50 mg Cd/dm³ prowadziło do obniżenia TAS odpowiednio o 43% i 58% w porównaniu do grupy kontrolnej.

U zwierząt, którym przez cały okres ekspozycji na 5 mg Cd/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ TAS było wyższe odpowiednio o 66% i 100% niż u szczurów nie otrzymujących cynku podczas narażenia na ten ksenobiotyk i nie różniło się względem grupy kontrolnej.

Także w grupach zwierząt, którym przez cały okres narażenia na 50 mg Cd/dm³ podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ TAS było wyższe odpowiednio 3.6-krotnie i 3.7-krotnie niż u szczurów nie otrzymujących cynku podczas narażenia na ten ksenobiotyk i wyższe odpowiednio o 51% i 54% względem grupy kontrolnej.

Uzyskane wyniki wskazują, iż zwiększone spożycie cynku (30 i 60 mg/dm³) zapobiegało obniżeniu TAS przy obu poziomach narażenia na kadm.



* $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$; względem ^akontroli, ^b30 mg Zn/dm³, ^c60 mg Zn/dm³, ^d5 mg Cd/dm³, ^e5 mg Cd/dm³ + 30 mg Zn/dm³, ^g50 mg Cd/dm³.

↑ wzrost w stosunku do grupy kontrolnej; ↓ obniżenie w porównaniu do odpowiedniej grupy narażanej na kadm (5 lub 50 mg Cd/dm³)

Rycina 19. Stosunek TOS/TAS (OSI) w tkance kostnej żuchwy.

Wskaźnik stresu OSI w tkance kostnej żuchwy szczurów kontrolnych wynosił 0,0079. U zwierząt, którym przez 12 miesięcy podawano cynk w stężeniu 30 i 60 mg/dm³ wartość tego parametru nie różniła się w porównaniu do grupy kontrolnej.

Narażenie na kadm w stężeniu 5 mg/dm³ spowodowało znaczny, aż 5.8-krotny wzrost OSI względem grupy kontrolnej. W grupie zwierząt, której podczas narażenia na kadm w tym stężeniu podawano 30 lub 60 mg Zn/dm³ OSI był niższy odpowiednio 11-krotnie i 3.8-krotnie względem grupy, której nie podawano cynku w czasie narażenia na ten ksenobiotyk oraz nie różnił się względem grupy kontrolnej.

Ekspozycja na kadm w stężeniu 50 mg/dm³ spowodowała również znaczny, aż 7.3-krotny wzrost OSI względem grupy kontrolnej. U zwierząt otrzymujących 30 lub 60 mg Zn/dm³ przez cały okres narażenia na ten metal OSI był niższy niż w grupach szczurów, którym nie podawano cynku w czasie narażenia na ten ksenobiotyk odpowiednio 5-krotnie oraz 4,9-krotnie i nie różnił się względem grupy kontrolnej.

5.5 Analiza korelacji Pearsona

Analiza korelacji Pearsona wykazała dodatnią zależność pomiędzy stężeniem Zn a aktywnością SOD, CAT, GPx i stężeniem TAS w tkance kostnej żuchwy. Natomiast aktywność GR oraz stężenie DNA/RNA, PC, LPO, H₂O₂, TOS i OSI były ujemnie skorelowane ze stężeniem tego biopierwiastka (Tabela V).

Stwierdzono także ujemną korelację pomiędzy stężeniem Cd, a aktywnością GPx. Natomiast aktywność GR oraz stężenie DNA/RNA, PC, LPO, H₂O₂, TOS i OSI były dodatnio skorelowane ze stężeniem tego toksycznego metalu (Tabela V).

Wykazano też liczne korelacje pomiędzy wskaźnikami stanu oksydacyjno-redukcyjnego w tkance kostnej żuchwy (Tabela V). Stężenie TAS było dodatnio skorelowane z aktywnością SOD, CAT i GPx, natomiast ujemnie ze stężeniem DNA/RNA, PC, LPO, H₂O₂, TOS i OSI. Natomiast stężenie TOS było ujemnie skorelowane z aktywnością CAT i GPx, a dodatnio z aktywnością GR i stężeniem DNA/RNA, PC, LPO, H₂O₂ i OSI.

Tabela V. Korelacje Pearsona pomiędzy stężeniem Zn i Cd a wskaźnikami stanu oksydacyjno-redukcyjnego.

		Markery stanu antyoksydacyjnego					Markery stanu oksydacyjnego					
		SOD	CAT	GPx	GR	TAS	DNA/ RNA	PC	LPO	H ₂ O ₂	TOS	OSI
Markery stanu antyoksydacyjnego	CAT	0.406 ^{1‡}	-									
	GPx	0.680 [‡]	0.298 [*]	-								
	GR	NS	-0.236 [*]	NS	-							
	TAS	0.753 [‡]	0.718 [‡]	0.615 [‡]	NS	-						
Markery stanu oksydacyjnego	DNA/ RNA	NS	-0.477 [‡]	-0.236 [*]	0.572 [‡]	-0.329 [†]	-					
	PC	-0.441 [‡]	-0.625 [‡]	-0.613 [‡]	0.421 [‡]	-0.646 [‡]	0.795 [‡]	-				
	LPO	NS	-0.446 [‡]	-0.315 [†]	0.590 [‡]	-0.348 [†]	0.900 [‡]	0.844 [‡]	-			
	H ₂ O ₂	NS	-0.511 [‡]	NS	0.634 [‡]	-0.326 [†]	0.927 [‡]	0.742 [‡]	0.906 [‡]	-		
	TOS	NS	-0.230 [*]	-0.477 [‡]	0.447 [‡]	-0.289 [*]	0.669 [‡]	0.748 [‡]	0.716 [‡]	0.595 [‡]	-	
	OSI	-0.377 [†]	-0.495 [‡]	-0.563 [‡]	0.379 [†]	-0.598 [‡]	0.645 [‡]	0.839 [‡]	0.713 [‡]	0.686 [‡]	0.831 [‡]	
Zn		0.291 [*]	0.413 [‡]	0.502 [‡]	-0.380 [†]	0.437 [‡]	-0.544 [‡]	-0.639 [‡]	-0.552 [‡]	-0.557 [‡]	-0.553 [‡]	-0.527 [‡]
Cd ¹		NS	NS	-0.507 [‡]	0.431 [‡]	NS	0.484 [‡]	0.549 [‡]	0.431 [‡]	0.656 [‡]	0.738 [‡]	0.608 [‡]

¹Wartości przedstawiają współczynnik korelacji r, gdzie * p < 0,05; † p < 0,01; ‡ p < 0,001; NS p > 0,05

VI. Dyskusja

Stres oksydacyjny definiuje się jako brak równowagi między wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT) i systemem obrony antyoksydacyjnej. Nadmiar wolnych rodników upośledza zdolność antyoksydacyjną organizmu i prowadzi do uszkodzenia makrocząsteczek komórkowych takich, jak lipidy, białka, kwasy nukleinowe i ostatecznie wpływa na funkcjonowanie komórek, tkanek i narządów [55].

Stres oksydacyjny leży też u podstaw rozwoju licznych schorzeń w organizmie, w tym jamy ustnej, wliczając stany zapalne tkanek miękkich oraz destrukcję tkanek kostnych narządu żucia [10, 67, 70, 78, 161].

Kość jest dynamiczną tkanką, która odnawia się przez całe życie dzięki skoordynowanemu działaniu trzech głównych typów komórek kostnych tj. osteoklastów, osteoblastów i osteocytów. Proces przebudowy kości jest wynikiem interakcji między tymi komórkami, a wieloma czynnikami molekularnymi, w tym hormonami, czynnikami wzrostu i cytokinami [31, 124]. RFT są związane z procesem przebudowy tkanki kostnej, indukują apoptozę osteoblastów i osteocytów, co sprzyja osteoklastogenezie oraz hamują mineralizację i osteogenezę. Ponadto nadmierna apoptoza osteocytów prowadzi do zwiększonego obrotu kostnego na korzyść osteoklastogenezy, co skutkuje utratą masy kostnej [31, 124].

Stres oksydacyjny jest także jednym z mechanizmów działania toksycznego wielu ksenobiotyków, na które człowiek może być narażony przez całe życie, w tym kadmu, który należy do najbardziej toksycznych metali ciężkich [5, 27, 28, 49, 92, 150]. Długotrwała, niska ekspozycja na ten pierwiastek, która aktualnie ma miejsce w krajach wysoko uprzemysłowionych, może negatywnie wpływać na kości i przyczyniać się do rozwoju schorzeń układu kostnego [19, 150].

Ze względu na fakt, iż narażenie na kadm będzie wzrastało poszukuje się sposobów, pozwalających ograniczyć jego wchłanianie z diety oraz niekorzystny wpływ na zdrowie. Szczególną uwagę zwraca się na możliwość wykorzystania w tym celu czynników pokarmowych o właściwościach antyoksydacyjnych, wliczając cynk. W badaniach laboratoryjnych wykazano, że cynk zmniejsza absorpcję kadmu z przewodu pokarmowego, kumulację w nerkach i wątrobie oraz zapobiega jego działaniu nefro-, neuro- i osteotoksycznemu [13, 15, 16, 112].

W warunkach przewlekłego narażenia kadm ulega kumulacji głównie w nerkach i kościach, a działanie nefro- i osteotoksyczne tego ksenobiotyku było przedmiotem licznych

badania i jest szeroko opisane [13 - 16]. Jednak wpływ jonów Cd^{2+} na tkankę kostną żuchwy nie był dotychczas przedmiotem tak licznych badań, dlatego też jest niedostatecznie poznany.

Dostępne dane epidemiologiczne wskazują, iż narażenie środowiskowe ludzi na ten metal może skutkować jego kumulacją w zębach i w żuchwie [12, 42, 84]. Browar i wsp. [12] odnotowali wyższe stężenie Cd w kości wyrostka zębodołowego żuchwy w porównaniu z kością podstawną. Dodatkowo analiza korelacji wykazała związek między poziomem Cd w kości wyrostka zębodołowego żuchwy, a występowaniem chorób przyzębia, co może mieć istotny wpływ na progresję zmian w kościach związanych z tymi chorobami. Ponadto autorzy sugerują, że wpływ Cd na choroby przyzębia jest spowodowany jego bezpośrednim działaniem osteotoksycznym na kość wyrostka zębodołowego. Fischer i wsp. [42] wykazali, że stężenie Cd w zębach mlecznych pochodzących od osób zdrowych, mieszkających na terenie Górnego Śląska, który jest jednym z najbardziej zanieczyszczonych terenów w Polsce, było istotnie wyższe niż w zębach stałych. Ponadto zęby zlokalizowane w szczęce zawierały wyższe stężenia metali niż zęby żuchwy. Także Malara i wsp. [84] stwierdzili, że stężenie kadmu i ołowiu w próbkach zębów i kości pochodzących od osób mieszkających w stosunkowo zanieczyszczonym rejonie, silnie uprzemysłowionej Rudy Śląskiej było znacznie wyższe w porównaniu z mieszkańcami Bielsko-Białej, a według autorów, przeprowadzone badania wskazują, że zęby żuchwy i otaczające je kości mogą odzwierciedlać środowiskowe narażenie ludzi na te toksyczne metale.

W badaniach własnych odnotowano zależny od poziomu narażenia wzrost stężenia kadmu w tkance kostnej żuchwy szczurów, która ma zbliżoną budowę do tkanki kostnej występującej w całym szkielecie, w tym do dystalnego odcinka kości udowej, gdzie dominuje kość o strukturze gąbczastej [12]. Cytowane w literaturze stężenia kadmu w kościach zwierząt nie narażanych na ten metal były zbieżne z oznaczonymi w niniejszej pracy [15 - 17, 57]. Kumulacja kadmu w tkance kostnej żuchwy, chociaż niższa niż w narządach tarczowych [111, 112], świadczy o tym, że żuchwa jest ważnym narządem w dystrybucji tego toksycznego metalu.

Pomimo, iż jony Cd^{2+} wykazują działanie prooksydacyjne, a zaburzenie równowagi pomiędzy oksydantami, a antyoksydantami odgrywa znaczącą rolę w funkcjonowaniu układu kostnego, dopiero niedawno zwrócono uwagę na możliwość wpływu tego toksycznego metalu na kości na drodze stresu oksydacyjnego. Jak wspomniano we wstępie pracy, metal ten nie wykazuje zdolności do bezpośredniego wytwarzania RFT, ale na drodze mechanizmów pośrednich może prowadzić do indukcji stresu. Mechanizm ten obejmuje osłabienie bariery antyoksydacyjnej, wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej i zakłócenie przepływu

elektronów w łańcuchu oddechowym oraz uwalnianie metali o wysokiej aktywności redoks, głównie Fe^{2+} i Cu^+ , z miejsc ich występowania [27, 28, 49].

Tkanka kostna posiada mechanizmy obronne chroniące ją przed szkodliwym działaniem RFT. Bariera antyoksydacyjna kości składa się z przeciwutleniaczy enzymatycznych, takich jak GPx, SOD i CAT, oraz nieenzymatycznych, w tym GSH i Mt. GPx jest głównym składnikiem enzymatycznego, komórkowego systemu obrony antyoksydacyjnej w tkance kostnej. Enzym ten jest odpowiedzialny za rozkład nadtlenków lipidów i wraz z CAT katalizuje redukcję H_2O_2 do tlenu i wody. Natomiast SOD jest odpowiedzialna za reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego $\text{O}_2^{\cdot-}$ do tlenu cząsteczkowego i H_2O_2 [131, 140].

Niniejsze badania wykazały, że umiarkowana i stosunkowo wysoka ekspozycja na Cd osłabiała zdolność antyoksydacyjną tkanki kostnej zuchwy i prowadziła do rozwoju stresu oksydacyjnego.

Stwierdzono, że podawanie szczurom 5 i 50 mg Cd/dm^3 przez 12 miesięcy skutkowało obniżeniem aktywności GPx (odpowiednio o 48% i 68%), SOD (odpowiednio o 33% i 46%) i CAT (o 63%) przy narażeniu na 50 mg Cd/dm^3 w porównaniu do zwierząt kontrolnych i nie miało wpływu na aktywność GR. W tym badaniu narażenie szczurów na kadm prowadziło także do obniżenia TAS (odpowiednio o 43% i 58%), co można wytłumaczyć osłabieniem enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej pod wpływem tego ksenobiotyku.

Obniżenie aktywności GPx, SOD i CAT przez kadm może wynikać ze zdolności tego metalu do usuwania biopierwiastków z ich centrów aktywnych i wiązania się z grupami -SH [15 - 17, 45, 174]. Ujemna korelacja między stężeniem Cd a aktywnością GPx w tkance kostnej potwierdza możliwość jego bezpośredniego wpływu na enzymatyczną barierę antyoksydacyjną.

Kadm może również pośrednio wpływać na enzymy antyoksydacyjne poprzez zubożenie organizmu w biopierwiastki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania tych enzymów, takie jak selen (Se), cynk, miedź, mangan (Mn) i żelazo. Wielu autorów opisało zaburzenia gospodarki tymi metalami w warunkach ekspozycji na kadm [8, 9, 16, 45, 112]. Wykazano, że inhibicja aktywności GPx, CAT i SOD jest wynikiem wypierania przez jony kadmu Se^{2+} z GPx, Fe^{3+} z CAT oraz Zn^{2+} , Cu^+ i Mn^{2+} z centrum aktywnego SOD [8, 16, 45, 49, 112]. Ponadto obniżenie aktywności SOD w tkance kostnej zuchwy tych zwierząt, przynajmniej częściowo, może być wynikiem zmniejszenia stężenia cynku w tej tkance, co stwierdzono w badaniach własnych, przy obu poziomach narażenia na kadm (odpowiednio o 28% i 27%). Obniżenie stężenia cynku, stwierdzono także w kości udowej tych szczurów (odpowiednio o 7% i 19%) [16].

Oslabienie bariery antyoksydacyjnej przez kadm doprowadziło do zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w tkance kostnej żuchwy i w konsekwencji do nadmiernego generowania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Do RFT zalicza się H_2O_2 , którego stężenie u zwierząt eksponowanych na 50 mg Cd/dm^3 było 2-krotnie wyższe niż u szczurów kontrolnych, co świadczy o wzmożonej produkcji i kumulacji RFT w tkance kostnej żuchwy. Wzrost ilości H_2O_2 pod wpływem kadmu, może być również wynikiem uwalniania metali przejściowych, takich jak miedź i żelazo z celuloplazminy i ferrytyny. Żelazo może być również uwalniane z mitochondrialnych enzymów oddechowych, a wolne jony tych metali mogą wchodzić w reakcję Fentona wytwarzając bardzo toksyczny rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) [9, 27, 28, 49].

Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem Cd a H_2O_2 potwierdza oddziaływanie tego metalu na tkankę kostną na drodze stresu oksydacyjnego. Chociaż H_2O_2 jest naturalnym produktem metabolizmu komórkowego, to ze względu na właściwości utleniające jest bardzo toksyczny dla cząsteczek i struktur komórkowych. Wykazuje on zdolność do indukcji peroksydacji lipidów błon komórkowych oraz oksydacyjnych uszkodzeń białek i łańcuchów kwasów nukleinowych [55].

W badaniach własnych oksydacyjne modyfikacje białek kostnych oceniano w oparciu o pomiar stężenia białek karbonylowych (PC), a zwiększoną peroksydację lipidów jako stężenie nadtlenników lipidów (LPO), natomiast uszkodzenia oksydacyjne kwasów nukleinowych w oparciu o pomiar 8-OHG, 8-OHdG i 8-hydroksyguaniny (DNA/RNA). Odnotowano, że 12 miesięczna ekspozycja na 5 i 50 mg Cd/dm^3 prowadziła do wzrostu stężenia PC (odpowiednio 3,6- i 3,4- krotnego), nasilenia peroksydacji lipidów (wzrost LPO odpowiednio o 63% i 45%) i uszkodzenia kwasów nukleinowych (wzrost DNA/RNA o 16%). W tkance kostnej żuchwy u tych szczurów stwierdzono również wzrost stężenia TOS (odpowiednio 3,6- i 3,1- krotny) i wskaźnika stresu oksydacyjnego (odpowiednio 5,8- i 7,3- krotny) oraz obniżenie TAS (odpowiednio o 43% i 58%) w stosunku do zwierząt kontrolnych. Ponadto dodatnie korelacje między stężeniem kadmu a PC, LPO, DNA/RNA, TOS i OSI potwierdzają wpływ tego metalu na oksydacyjne uszkodzenia makrocząsteczek komórkowych w tkance kostnej żuchwy.

Oksydacyjne modyfikacje kwasów nukleinowych są jednymi z najpoważniejszych skutków generowanego przez kadm stresu oksydacyjnego. Leżą u podstaw rakotwórczego działania tego pierwiastka i mogą mieć poważne konsekwencje dla zdrowia [27, 28, 49, 172]. Uszkodzenia DNA u zwierząt eksponowanych na kadm opisali także inni badacze. Gałżyn-Sidorczuk i wsp. [44] wykazali wzrost stężenia 8-OHdG w surowicy szczurów, którym przez

12 tygodni podawano 50 mg Cd/dm³. Natomiast Mężyńska i wsp. [93] w wątrobie szczurów karmionych dietą zawierającą 1 i 5 mg Cd/kg przez 24 miesiące wykazała wzrost stężenia 8-OHdG przy niższym poziomie narażenia po 17 i 24 miesiącach (odpowiednio 2- i 2,3-krotny), natomiast przy wyższym już od 10. miesiąca (od 2- do 2,4-krotnie). Także u ludzi, w badaniach prowadzonych przez Engström i wsp. [33] u mieszkank Bangladeszu eksponowanych na kadm z dietą i wodą pitną stężenie 8-OHdG w moczu było podwyższone, a dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem tego biomarkera, a stężeniem kadmu w moczu potwierdza udział tego metalu w indukcji stresu oksydacyjnego.

Konsekwencją indukowanego przez kadm zwiększenia stężenia RFT, w tym H₂O₂ jest uszkodzenie oksydacyjne białek kostnych i nasilenie peroksydacji lipidów, co potwierdza dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem H₂O₂ a PC i LPO. Wzrost stężenia PC świadczy o rozwoju stresu oksydacyjnego i jest konsekwencją zmian w strukturze białek kostnych i w rezultacie utraty ich aktywności biologicznej. Nasilenie peroksydacji lipidów skutkuje natomiast utratą integralności błon biologicznych, w tym lizosomalnych i uwolnieniem enzymów hydrolitycznych do wnętrza komórki i ostatecznie zniszczeniem komórki [55].

Potwierdzeniem badań własnych są wyniki uzyskane przez Brzósę i wsp. [15, 17]. Autorzy w tkance kostnej o strukturze gąbczastej pochodzącej z odcinka proksymalnego kości udowej, u szczurów narażanych na 5 i 50 mg Cd/dm³ przez 6 miesięcy, wykazali obniżoną aktywność GPx, SOD i CAT oraz stężenie TAS w porównaniu do grupy kontrolnej. Przy obu poziomach narażenia na ten toksyczny metal stwierdzono także wzrost stężenia H₂O₂, PC, 8-OHdG, TOS i OSI, a stężenie LPO było wyższe jedynie przy narażeniu na 50 mg Cd/dm³. Natomiast w mózgu tych szczurów przy narażeniu na 5 mg Cd/dm³, autorzy wykazali niższą niż w grupie kontrolnej, aktywność GPx, SOD i CAT oraz stężenie TAS [13].

Również badania Kosteckiej-Sochoń i wsp. [69], przynajmniej częściowo, potwierdzają uzyskane w niniejszej pracy wyniki. Autorka w tym samym modelu doświadczalnym (12 miesięczna ekspozycja szczurów na 5 i 50 mg Cd/dm³) ale w śliniance podjęzykowej, wykazała przy obu poziomach narażenia zmniejszenie aktywności SOD (odpowiednio o 26% i 33%) i GPx (odpowiednio o 39% i 38%) w stosunku do grupy kontrolnej. Nie odnotowała natomiast wpływu kadmu na aktywność CAT w tym gruczole. Autorka stwierdziła również, że ekspozycja na kadm w obu stężeniach prowadziła do wzrostu poziomu H₂O₂ (odpowiednio o 26% i 96%) i LPO (odpowiednio 2,2-krotny i 3-krotny) oraz obniżenia TAS (odpowiednio o 49% i 44%), wzrostu TOS (odpowiednio 1,7- i 2-krotnie) i OSI odpowiednio 2,7- i 3,1-krotnie w porównaniu z grupą kontrolną [70].

Także Al Ibrahim i wsp. [3] w kości udowej u szczurów, którym podawali podskórnice 3 mg Cd/kg m.c. przez 12 tygodni wykazali zahamowanie aktywności CAT, SOD i GPx (odpowiednio o 36%, 29% i 54%) oraz wzrost stężenia PC o 81% i LPO o 79% w porównaniu do kontroli. Również Yang i wsp. [158] w homogenatach kości udowej myszy narażanych na 50 mg Cd/L przez 12 tygodni stwierdzili niższą aktywność CAT, SOD i GPx niż w grupie kontrolnej, a uzyskane wyniki potwierdzili badaniami immunohistochemicznymi. Ponadto ekspozycja na kadm u tych myszy prowadziła do wzrostu stężenia MDA w badanej tkance.

Yin i wsp. [161] w żuchwach myszy z nokautem genu *Bmi1* (*Bmi1*^{-/-}) oceniali aktywność SOD i GPx oraz markery uszkodzenia DNA (γ -H2AX i 8-oksoguaninę). *Bmi1* odgrywa ważną rolę w stymulowaniu tworzenia zębiny i kości wyrostka zębodołowego żuchwy poprzez utrzymywanie homeostazy redoks. Aktywność SOD i GPx u tych zwierząt była niższa, natomiast stężeni γ -H2AX i 8-oksoguaniny było wyższe w porównaniu do myszy kontrolnych.

Do zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w kościach żuchwy i tkankach miękkich jamy ustnej prowadzi także radioterapia [78]. W napromieniowanych tkankach kości żuchwy i języka szczurów, 28 dni po zastosowaniu pojedynczej dawki 30 Gy, stwierdzono zwiększoną ekspresję 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny oraz obniżoną ekspresję SOD2.

Zaburzenia równowagi redoks w tkance szczęki i żuchwy opisano również u ludzi. Borys i wsp. [10] wykazali, że tytanowe implanty (stop tytanu Ti6Al4V) prowadzą do zaburzenia równowagi redoks w tych tkankach. Autorzy w okostnej otaczającej tytanowe implanty żuchwy wykazali obniżenie aktywności SOD i stężenia TAS odpowiednio o 55% i 59%, natomiast poziom dialdehydu malonowego (MDA), 4-hydroksynonenalu (4-HNE), TOS oraz OSI były istotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio o 29%, 114%, 99% i 250%).

Wyniki badań własnych oraz nieliczne dane innych autorów wskazują, że cynk może odgrywać ważną rolę w ochronie tkanki kostnej przed toksycznym działaniem kadmu [15, 16, 85, 175].

Ochronne działanie cynku na kości jest złożone. Pierwiastek ten stymuluje wzrost tkanki kostnej poprzez aktywację enzymów wspomagających syntezę DNA, RNA i białka. Zwiększa również aktywność osteoblastów i wspomaga syntezę kolagenu. Z drugiej strony hamuje osteoklastyczną resorpcję kości i tym samym zwiększa obrót kostny na korzyść tworzenia kości [39, 175].

Ponadto cynk ma silne działanie przeciwutleniające i jak wykazano w wielu badaniach, może chronić przed indukowanym kadmem stresem oksydacyjnym w różnych tkankach i narządach oraz osłabiać efekty działania tego toksycznego metalu [13, 15, 16, 45, 69, 70, 111,

112]. Biorąc powyższe pod uwagę wysunięto hipotezę, że biopierwiastek ten będzie mógł przynajmniej częściowo chronić przed zaburzeniami równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w tkance kostnej żuchwy i osłabiać uszkodzenia oksydacyjne makrocząsteczek komórkowych będące skutkiem stresu. Dotychczas nie badano jednak wpływu cynku na tkankę kostną żuchwy w warunkach narażenia na kadm, a niniejsze badania są pierwszymi w tym zakresie.

Wyniki przeprowadzonych badań własnych jednoznacznie wskazują, że zwiększona podaż cynku o 71% i 146% w stosunku do jego spożycia z dietą standardową chroni enzymatyczną barierę antyoksydacyjną i zapobiega oksydacyjnym uszkodzeniom makromolekuł komórkowych w warunkach umiarkowanego (5 mg Cd/dm^3) i względnie wysokiego (50 mg Cd/dm^3), długotrwałego narażenia na kadm. Wykazano, iż suplementacja cynkiem podczas narażenia na kadm może całkowicie zapobiegać zahamowaniu aktywności GPx, SOD i CAT, a nawet zwiększać aktywność CAT. Zwiększona aktywność SOD i GPx wynika z faktu, iż cynk jest kofaktorem SOD, a jego zwiększone spożycie ułatwia biodostępność selenu, który jest kofaktorem GPx [131]. Suplementacja cynkiem w warunkach narażenia na kadm chroni także przed obniżeniem TAS tkanki kostnej żuchwy. Ponadto dodatnie korelacje między stężeniem tego biopierwiastka, a aktywnością GPx, SOD, CAT i TAS potwierdzają możliwość jego bezpośredniego, korzystnego wpływu na enzymatyczną barierę antyoksydacyjną i całkowity stan antyoksydacyjny tej tkanki.

Brzóska i wsp. [15] wykazali, że suplementacja cynkiem podczas ekspozycji szczurów na 5 i 50 mg Cd/dm^3 przez 6 miesięcy całkowicie zapobiegła obniżeniu aktywności CAT i częściowo aktywności GPx, nie miała natomiast wpływu na aktywność SOD w tkance kości udowej. Natomiast Kostecka i wsp. [69] u tych samych zwierząt, co badane w niniejszej pracy, wykazała że zwiększona podaż cynku (60 mg Zn/dm^3) podczas narażenia jedynie na 5 mg Cd/dm^3 zapobiegła obniżeniu aktywności SOD w śliniance podjęzykowej. Suplementacja cynkiem podczas narażenia na kadm nie wpływała natomiast na aktywność CAT i GPx.

Ważnym wynikiem niniejszej pracy jest wykazanie, iż podawanie cynku podczas ekspozycji na kadm chroni przed nadmierną kumulacją nadtlenu wodoru w tkance kostnej żuchwy i tym samym zapobiega rozwojowi stresu oksydacyjnego oraz jego skutków.

W badaniach Śliwińskiego i wsp. [132] wykazano, że cynk chroni ludzkie limfocyty przed cytotoksycznością i genotoksycznością H_2O_2 , ale nasila jego toksyczność w komórkach raka ludzkiej białaczki szpikowej K562. Biopierwiastek ten w stężeniach 10 - $1000 \mu\text{M}$ zmniejszał żywotność komórek nowotworowych i efekt ten, zwłaszcza przy niskich stężeniach tego biopierwiastka, był znacznie wyraźniejszy niż w normalnych komórkach. Cynk nie wywoływał uszkodzeń DNA w normalnych komórkach, ale powodował je w komórkach

rakowych. Hamował w nich także naprawę uszkodzeń DNA indukowanych przez H_2O_2 . Autorzy badań sugerują, że cynk może chronić normalne komórki przed działaniem uszkadzającym DNA i nasilać to działanie w komórkach nowotworowych, co wskazuje na podwójne działanie tego biopierwiastka w zależności od komórek docelowych i może być przydatne w terapii nowotworowej.

Fakt, że Zn całkowicie zapobiegał wywołanemu przez Cd wzrostowi stężeń PC, LPO, TOS, uszkodzeń DNA/RNA oraz wartości wskaźnika OSI wskazuje, że biopierwiastek ten zapobiegał stresowi oksydacyjnemu i uszkodzeniom oksydacyjnym białek, lipidów i kwasów nukleinowych w tkance kostnej żuchwy. Ponadto wykazanie, że suplementacja cynkiem (30 i 60 mg Zn/dm³) u zwierząt nie narażanych na kadm obniżyła stężenie H_2O_2 i DNA/RNA w tkance kostnej żuchwy, dostarcza ważnych dowodów na bezpośredni korzystny wpływ tego biopierwiastka na tą tkankę i potwierdza ochronny wpływ zwiększonego spożycia cynku na kumulację H_2O_2 i oksydacyjne uszkodzenia DNA/RNA wywołane przez Cd.

Także w badaniach Brzóska i wsp. [15] wykazano, że 6 miesięczne podawanie cynku w stężeniu 30 i 60 mg/dm³ u szczurów narażanych na kadm znacząco obniżyło stężenie 8-OHdG, PC, LPO, TOS oraz wartości OSI w tkance kostnej kości udowej w stosunku do zwierząt kontrolnych. Ponadto sam cynk, tak jak w niniejszej pracy, znacznie obniżył stężenie 8-OHdG (odpowiednio o 64% i 62%) względem grupy kontrolnej.

Potwierdzeniem badań własnych są wyniki uzyskane przez Kostecką-Sochoń i wsp. [70] w tym samym modelu doświadczalnym. Autorzy stwierdzili, że cynk całkowicie zapobiegał wzrostowi stężenia H_2O_2 , LPO, TOS i OSI oraz chronił przed obniżeniem TAS w śliniance podjęzykowej szczurów.

Brak danych literaturowych dotyczących tematyki niniejszej pracy nie pozwala na szerszą dyskusję wyników badań własnych.

Najważniejszym wynikiem przeprowadzonych badań jest wykazanie, iż podawanie zwierzętom cynku podczas ekspozycji na kadm w istotny sposób chroni przed nadmierną kumulacją H_2O_2 , obniżeniem aktywności GPx, SOD i CAT oraz oksydacyjnymi uszkodzeniami białek, lipidów i kwasów nukleinowych.

Biorąc pod uwagę wyniki badań uzyskanych w niniejszej pracy, jak również innych autorów, można wnioskować, że ochronne działanie cynku, w warunkach narażenia na kadm można wytłumaczyć bezpośrednim działaniem antyoksydacyjnym tego biopierwiastka lub jego interakcją z kadmem [15 - 17, 45, 69, 70, 111, 112]. Oba metale współzawodniczą na etapie absorpcji w przewodzie pokarmowym o te same białka transportujące [6]. Dlatego też, dieta bogata w cynk może obniżać wchłanianie kadmu z jelit, a tym samym jego kumulację w

organizmie i w rezultacie zmniejszać działanie toksyczne tego metalu. W niniejszym badaniu stężenie Cd w tkance kostnej żuchwy u szczurów, które były suplementowane cynkiem podczas narażenia na 5 i 50 mg Cd/dm³ było niższe niż u zwierząt, którym nie podawano tego biopierwiastka.

Ochronna rola cynku w warunkach narażenia na kadm związana jest również ze zdolnością tego biometalu do indukcji syntezy MT w różnych tkankach organizmu, głównie w wątrobie i nerkach, ale także w tkance kostnej, która wiąże kadm w kompleksy Cd-MT i odgrywa znaczącą rolę w jego detoksykacji [6, 9, 14, 112]. Jony Cd²⁺ związane z MT nie wykazują działania toksycznego, a zatem nie indukują też stresu oksydacyjnego.

W świetle dostępnych danych literaturowych przedstawiana praca jest pierwszą, w której oceniano i wykazano ochronny wpływ zwiększonego spożycia cynku wobec zaburzeń równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w tkance kostnej żuchwy szczurów podczas ekspozycji na kadm. Wyniki badań własnych jednoznacznie wskazują, iż zwiększenie podaży tego biopierwiastka o 71% oraz 146% w warunkach umiarkowanego (5 mg Cd/dm³) i względnie wysokiego (50 mg Cd/dm³) przewlekłego narażenia na kadm zwiększa aktywność GPx, SOD i CAT oraz całkowicie zapobiega nagromadzeniu H₂O₂ i chroni przed oksydacyjnymi uszkodzeniami białek, kwasów nukleinowych i lipidów.

Wykazanie w modelu doświadczalnym umiarkowanego i względnie wysokiego narażenia człowieka na Cd, że suplementacja Zn ma ochronny wpływ na zaburzenia metabolizmu tkanki kostnej wywołane przez ten toksyczny metal i wynika ze zdolności tego biopierwiastka do zapobiegania stresowi oksydacyjnemu i jego skutkom, jest najważniejszym, a zarazem praktycznym odkryciem tego badania. Może bowiem stanowić przesłankę do podjęcia badań mających na celu wykorzystanie preparatów cynkowych w profilaktyce zagrożeń dla zdrowia u osób narażonych na kadm.

VII. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Umiarkowane i względnie wysokie narażenie przewlekłe na kadm indukuje stres oksydacyjny w tkance kostnej żuchwy szczura. Charakter i nasilenie zmian nie zależny od poziomu narażenia na ten ksenobiotyk.
2. Kadm osłabia enzymatyczną barierę antyoksydacyjną (obniżenie aktywności SOD, CAT i GPx) oraz zwiększa oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych, białek i lipidów (wzrost stężenia DNA/RNA, PC i LPO) w tkance kostnej żuchwy.
3. Chroniczna ekspozycja na kadm obniża całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS) tkanki kostnej żuchwy i zwiększa całkowity stan oksydacyjny (TOS) oraz wskaźnik stresu (OSI).
4. Zwiększenie podaży cynku o 71% w przypadku braku narażenia na kadm obniża stężenie nadtlenu wodoru oraz zmniejsza oksydacyjne uszkodzenia DNA/RNA.
5. Zwiększenie podaży cynku o 146% w sytuacji braku narażenia na kadm obniża aktywność GR, zmniejsza oksydacyjne uszkodzenia DNA/RNA i peroksydację lipidów oraz stężenie nadtlenu wodoru w tkance kostnej żuchwy.
6. Zwiększenie podaży cynku w stosunku do spożycia tego biopierwiastka z dietą standardową o 71% i 146% w warunkach narażenia na kadm całkowicie chroni przed utlenianiem kwasów nukleinowych, białek i lipidów oraz zapobiega nagromadzeniu H_2O_2 w badanej tkance.
7. Zwiększenie spożycia cynku o 71% podczas umiarkowanego i względnie wysokiego narażenia na kadm nie tylko całkowicie zapobiega powodowanemu przez ten ksenobiotyk obniżeniu TAS, ale również chroni przed wzrostem TOS, co skutkuje zmniejszonym rozwojem stresu oksydacyjnego w tkance kostnej żuchwy.
8. Zwiększenie podaży cynku o 146% podczas umiarkowanego i względnie wysokiego narażenia na kadm całkowicie zapobiega powodowanemu przez ten ksenobiotyk obniżeniu TAS i zwiększeniu wskaźnika stresu OSI oraz częściowo chroni przed wzrostem TOS.
9. Podawanie cynku podczas ekspozycji na kadm zapobiega rozwojowi stresu oksydacyjnego i jego skutków w tkance kostnej żuchwy.

VIII. Streszczenie w języku polskim

Stres oksydacyjny leży u podstaw rozwoju licznych schorzeń w organizmie, w tym jamy ustnej, wliczając stany zapalne tkanek miękkich oraz destrukcję tkanek kostnych narządu żucia [10, 67, 70, 78, 161].

Stres oksydacyjny jest także jednym z mechanizmów działania toksycznego wielu ksenobiotyków, na które człowiek może być narażony przez całe życie, w tym kadmu, który należy do najbardziej toksycznych metali ciężkich [5, 27, 28, 49, 92, 150]. Długotrwała, niska ekspozycja na ten pierwiastek, która aktualnie ma miejsce w krajach wysoko uprzemysłowionych, może negatywnie wpływać na kości i przyczyniać się do rozwoju schorzeń układu kostnego [19, 150]. Ze względu na fakt, iż narażenie na kadm będzie wzrastało poszukuje się sposobów, pozwalających ograniczyć jego wchłanianie z diety oraz niekorzystny wpływ na zdrowie. Szczególną uwagę zwraca się na możliwość wykorzystania w tym celu czynników pokarmowych o właściwościach antyoksydacyjnych, wliczając cynk. Biopierwiastek ten może chronić przed rozwojem stresu oksydacyjnego indukowanego przez kadm w narządach mięsnych [13, 45, 70, 111], dlatego też w badaniach własnych oceniano, czy zwiększona podaż cynku może chronić przed stresem oksydacyjnym również w tkance kostnej żuchwy.

Badania przeprowadzono na dorosłych szczurach, samcach szczepu Wistar [CrI:WI(Han)], którym podawano wodny roztwór chlorku kadmu (CdCl_2) o stężeniu 5 lub 50 mg Cd/dm^3 i/lub roztwór chlorku cynku (ZnCl_2) o stężeniu 30 lub 60 mg Zn/dm^3 oraz paszę standardową typu LSM przez 12 miesięcy.

Dokonano oceny stanu antyoksydacyjnego (GPx, SOD, CAT, GR i TAS) i stanu oksydacyjnego (H_2O_2) oraz stopnia nasilenia stresu oksydacyjnego (OSI) w tkance kostnej żuchwy, jak również biomarkerów uszkodzeń oksydacyjnych lipidów (LPO), białek (PC) i kwasów nukleinowych (DNA/RNA) oraz stężenia Cd i Zn w tym narządzie.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zarówno umiarkowana (5 mg Cd/dm^3) jak i względnie wysoka (50 mg Cd/dm^3), chroniczna ekspozycja szczurów na kadm powadziła do osłabienia enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej, wzrostu stężenia prooksydantów, a w rezultacie rozwoju stresu oksydacyjnego i modyfikacji oksydacyjnych lipidów, białek i DNA/RNA w tkance kostnej żuchwy.

Najważniejszym wynikiem badań własnych jest wykazanie, po raz pierwszy, że zwiększenie spożycia cynku o 71% i o 146% podczas ekspozycji na kadm w istotny sposób

chroni przed nadmierną kumulacją H_2O_2 , obniżeniem aktywności GPx, SOD i CAT oraz oksydacyjnymi uszkodzeniami białek, lipidów i kwasów nukleinowych tego narządu.

Badania będące przedmiotem niniejszej pracy dostarczyły wiarygodnych dowodów, iż jony Zn^{2+} mogą chronić tkankę kostną przed uszkodzeniem powodowanym umiarkowanym i względnie wysokim narażeniem chronicznym na kadm. Przeprowadzone badania mają nie tylko wartość naukową i poznawczą, ale również istotne implikacje praktyczne. Wyniki badań własnych, wraz z rezultatami wcześniej przeprowadzonych badań w tym samym modelu doświadczalnym, pozwalają sądzić, iż suplementacja cynkiem może znaleźć zastosowanie w profilaktyce zagrożeń dla zdrowia wynikających z ekspozycji na kadm. Należy jednak podkreślić, że możliwość zastosowania cynku w zapobieganiu skutkom narażenia na kadm, w tym jego działaniu toksycznemu na tkankę kostną żuchwy u ludzi wymaga dalszych badań.

IX. Streszczenie w języku angielskim

Oxidative stress underlies the development of numerous diseases in the body, including oral cavity, such as inflammation of soft tissues and destruction of bone tissues of the masticatory apparatus [10, 67, 70, 78, 161].

Oxidative stress is also one of the mechanisms of toxicity of many xenobiotics, which a person can be exposed to throughout life, including cadmium, which is one of the most toxic heavy metals [5, 27, 28, 49, 92, 150]. Long-term, low exposure to this element, which currently occurs in highly industrialized countries, can negatively affect the bones and contribute to the development of bone diseases [19, 150]. Due to the fact that the risk of exposure to cadmium will increase in the future, solutions are being sought to limit its absorption from the diet and adverse effects on health. Particular attention is paid to the possibility of using for this purpose nutrients with antioxidant properties, including zinc. This bioelement can protect against the development of cadmium-induced oxidative stress in parenchymal organs [13, 45, 70, 111], therefore, in own research, it was examined whether an increased supply of zinc can also protect against oxidative stress in the mandibular bone tissue.

Studies were conducted in adult male rats of Wistar strain [CrI:WI(Han)] who were treated with cadmium chloride (CdCl_2) aqueous solution with concentration of 5 or 50 mg Cd/dm^3 and/or zinc chloride (ZnCl_2) solution with concentration of 30 or 60 mg Zn/dm^3 and LSM standard feed for 12 months.

Antioxidant status (GPx, SOD, CAT, GR, and TAS) and oxidative status (H_2O_2) were assessed, as well as the degree of severity of oxidative stress (OSI) in the mandibular bone tissue, as well as biomarkers of oxidative damage to lipids (LPO), proteins (PC), and nucleic acids (DNA/RNA), and Cd and Zn concentrations in this organ.

Conducted studies have shown that both moderate (5 mg Cd/dm^3) and relatively high (50 mg Cd/dm^3) chronic exposure of rats to cadmium led to a weakening of the enzymatic antioxidant barrier, an increase in the concentration of prooxidants, and as a result, the development of oxidative stress and oxidative modifications of lipids, proteins and DNA/RNA in the mandibular bone tissue.

The most important result of own research is demonstration, for the first time, that an increase in zinc intake of 71% and 146% during exposure to cadmium significantly protects against excessive accumulation of H_2O_2 , decrease in the activity of GPx, SOD and CAT, as well as oxidative damage to proteins, lipids and nucleic acids of this organ.

The studies in this paper provide solid evidence that Zn^{2+} ions can protect bone tissue from damage caused by moderate to relatively high chronic exposure to cadmium. The research carried out has not only scientific and cognitive value, but also important practical implications. The results of own research, together with the results of previous research in the same experimental model, suggest that zinc supplementation can be used in the prevention of health risks arising from exposure to cadmium. However, it should be stressed that the possibility of using zinc to prevent the effects of exposure to cadmium, including its toxicity to the human mandibular bone tissue, requires further studies.

X. Piśmiennictwo

1. Acquier A.B., De Couto Pita A.K., Busch L., Sanchez G.A.: Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. *Redox Report*, 2017, 22, 119–126.
2. Aebi H.E.: Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 1984, 105, 121–126.
3. Al Ibrahim T., Tarboush H.A., Aljada A., Al Mohanna M.: The effect of selenium and lycopene on oxidative stress in bone tissue in rats exposed to cadmium. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5, 1418-1427.
4. Ambati M., Rani K.R., Reddy P.V., Suryaprasanna J., Dasari R., Gireddy H.: Evaluation of oxidative stress in chronic periodontitis patients following systemic antioxidant supplementation: A clinical and biochemical study. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2017, 8, 1, 99–103.
5. ATSDR. Toxicological Profile for Cadmium. In Agency for Toxic Substances and Disease Registry; Public Health Service U.S. Department of Health and Human Services: Atlanta, GA, USA, 2012, 1–487.
6. Banni M., Messaoudi I., Said L., El Heni J., Kerkeni A., Said K.: Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 59, 513-519.
7. Bijowski K., Dąbrowska Z., Onopiuk P., Dąbrowska E.: Udział wybranych biopierwiastków w fizjologii i patologii narządu żucia. Holistyczny wymiar współczesnej medycyny. T. 6. Praca zbiorowa. Red. Krajewska-Kułak E., Łukaszuk C.R., Lewko J., Kułak W. Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, 2020, 318-333.
8. Bonda E., Włostkowski T., Krasowska A.: Metabolizm i toksyczność kadmu u człowieka i zwierząt. *Kosmos*, 2007, 1-2, 87-97.
9. Borowska S., Brzóska M.M., Gałążyn-Sidorczyk M., Rogalska J.: Effect of an extract from *Aronia melanocarpa* L. berries on the body status of zinc and copper under chronic exposure to cadmium: an in vivo experimental study. *Nutrients*, 2017, 9, 1374.
10. Borys J., Maciejczyk M., Krętowski A.J., Antonowicz B., Ratajczak-Wrona W., Jabłońska E., Załęski P., Waszkiel D., Ładny J.R., Żukowski P., Zalewska A.: The redox balance in erythrocytes, plasma, and periosteum of patients with titanium fixation of the jaw. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8, 386.

11. Browar A.W., Koufos E.B., Wei Y., Leavitt L.L., Prozialeck W.C., Edwards J.R.: Cadmium exposure disrupts periodontal bone in experimental animals: implications for periodontal disease in humans. *Toxics*, 2018, 6, 32.
12. Browar A.W., Leavitt L.L., Prozialeck W.C., Edwards J.R.: Levels of cadmium in human mandibular bone. *Toxics*, 2019, 7, 31.
13. Brzóska M.M., Kozłowska M., Rogalska J., Gałążyn-Sidorczuk M., Roszczenko A., Smereczański N.: Enhanced zinc intake protects against oxidative stress and its consequences in the brain: a study in an In vivo rat model of cadmium exposure. *Nutrients*, 2021, 13, 478.
14. Brzóska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J.: Bone metabolism of male rats chronically exposed cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 207, 195-211.
15. Brzóska M.M., Rogalska J.: Protective effect of zinc supplementation against cadmium-induced oxidative stress and the RANK/RANKL/OPG system imbalance in the bone tissue of rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 272, 208–220.
16. Brzóska M.M., Rogalska J., Gałążyn-Sidorczuk M., Jurczuk M., Roszczenko A., Kulikowska-Karpińska E., Moniuszko-Jakoniuk J.: Effect of zinc supplementation on bone metabolism in male rats chronically exposed to cadmium. *Toxicology*, 2007, 237, 89-103.
17. Brzóska M.M., Rogalska J., Kupraszewicz E.: The involvement of oxidative stress in the mechanisms of damaging cadmium action in bone tissue: A study in a rat model of moderate and relatively high human exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, 250, 327-335.
18. Buczko P., Knaś M., Grycz M., Szarmach I., Zalewska A.: Orthodontic treatment modifies the oxidant–antioxidant balance in saliva of clinically healthy subjects. *Advances in Medical Sciences*, 2017, 62, 129-135.
19. Buha A., Jugdaohsingh R., Matovic V., Bulat Z., Antonijevic B., Kerns J.G., Goodship A., Hart A., Powell J.J.: Bone mineral health is sensitively related to environmental cadmium exposure- experimental and human data. *Environmental Research*, 2019, 176, 108539.
20. Callan A.C., Devine A., Qi L., Ng J.C., Hinwood A.L.: Investigation of the relationship between low environmental exposure to metals and bone mineral density, bone resorption and renal function. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2015, 218, 444-451.

21. Chen C., Xun P., Nishio M., Sekikawa A., He K.: Cadmium exposure and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies and case-control studies among individuals without occupational exposure history. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22, 17465–17474.
22. Cheng Y., Chen H.: Aberrance of zinc metalloenzymes-induced human diseases and its potential mechanisms. *Nutrients*, 2021, 13, 4456.
23. Choromańska M., Klimiuk A., Kostecka-Sochoń P., Wilczyńska K., Kwiatkowski M., Okuniewska N., Waszkiewicz N., Zalewska A., Maciejczyk M.: Antioxidant defence, oxidative stress and oxidative damage in saliva, plasma and erythrocytes of dementia patients. Can salivary AGE be a marker of dementia? *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18, 2205.
24. Ciężka E., Surdacka A.: Rola śliny w procesie stresu oksydacyjnego – przegląd piśmiennictwa. *Dental Forum*, 2007, 35, 53-57.
25. Codex Alimentarius Commission. CODEX STAN 193–1995. In General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed; Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization: Rome, Italy, 2015, 30.
26. Compton J.T., Lee F.Y.: A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2014, 96, 1659–1668.
27. Czczot H., Majewska M.: Kadm – zagrożenie i skutki zdrowotne. *Farmacja Polska*, 2010, 66, 243-250.
28. Czczot H., Skrzycki M.: Kadm – pierwiastek całkowicie zbędny dla organizmu. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2010, 64, 38-49.
29. Dąbrowska Z.N., Bijowski K., Dąbrowska E., Pietruska M.: Effect of oxidants and antioxidants on oral health. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 2020, 26, 2, 87-93.
30. Deering K.E., Callan A.C., Prince R.L., Lim W.H., Thompson P.L., Lewis J.R., Hinwood A.L., Devine A.: Low-level cadmium exposure and cardiovascular outcomes in elderly Australian women: a cohort study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2018, 221, 347-354.
31. Domazetovic V., Marcucci G., Iantomasi T., Brandi M.L., Vincenzini M.T.: Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2017, 14, 209-216.
32. Duncan A., Yacoubian C., Watson N., Morrison I.: The risk of copper deficiency in patients prescribed zinc supplements. *Journal of Clinical Pathology*, 2015, 68, 723–725.

33. Engström K.S., Vahter M., Johansson G., Lindh C.H., Teichert F., Singh R., Kippler M., Nermell B., Raqib R., Strömberg U., Brob K.: Chronic exposure to cadmium and arsenic strongly influences concentrations of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, 48, 1211–1217.
34. Eom S.Y., Seo M.N., Lee Y.S., Park K.S., Hong Y.S., Sohn S.J., Kim Y.D., Choi B.S., Lim J.A., Kwon H.J., Kim H., Park J.D.: Low-level environmental cadmium exposure induces kidney tubule damage in the general population of Korean adults. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 73, 401-409.
35. Eron S.J., MacPherson D.J., Dagbay K.B., Hardy J.A.: Multiple mechanisms of zinc-mediated inhibition for the apoptotic caspases-3, -6, -7, and -8. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13, 1279–1290.
36. Fatima T., Rahim Z.B., Lin C.W., Qamar Z.: Zinc: a precious trace element for oral health care? *Journal of Pakistan Medical Association*, 2016, 66, 1019–1023.
37. Fejfer K., Buczek P., Niczyporuk M., Ładny J.R., Hady R.H., Knaś M., Maciejczyk M.: Oxidative modification of biomolecules in the nonstimulated and stimulated saliva of patients with morbid obesity treated with bariatric surgery. *BioMed Research International*, 2017, 4923769.
38. Fernández-Torres J., Plata-Rodríguez R., Zamudio-Cuevas Y., Martínez-Nava G., Landa-Solís C., Mendoza Soto L., Olivos-Meza A., Suárez-Ahedo C., Barbier O.C., Narváez-Morales J., Martínez-Flores K.: Effect of cadmium on the viability on monolayer cultures of synoviocytes, chondrocytes, and Hoffa: a preliminary study. *Toxicology and Industrial Health*, 2020, 36, 940-945.
39. Ferreira E.C.S., Bortolin R.H., Freire-Neto F.P., Souza K.S.C., Bezerra J.F., Ururahy M.A.G., Ramos A.M.O., Himelfarb S.T., Abreu B.J., Didone T.V.N., Pedrosa L.F.C., Medeiros A.C., Doi S.Q., Brandão-Neto J., Hirata R.D.C., Rezende L.A., Almeida M.G., Hirata M.H., Rezende A.A.: Zinc supplementation reduces RANKL/OPG ratio and prevents bone architecture alterations in ovariectomized and type 1 diabetic rats. *Nutrition Research*, 2017, 40, 48–56.
40. Ferreira R.O., Aragão W.A.B., Bittencourt L.O., Fernandes L.P.M., Balbinot K.M., Alves-Junior S.M., Pinheiro J.J.V., Maia C.D.S.F., Crespo-Lopez M.E., Lima R.R.: Ethanol binge drinking during pregnancy and its effects on salivary glands of offspring rats: oxidative stress, morphometric changes and salivary function impairments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 133, 110979.

41. Filippini T., Cilloni S., Malavolti M., Violi F., Malagoli C., Tesauro M., Bottecchi I., Ferrari A., Vescovi L., Vinceti M.: Dietary intake of cadmium, chromium, copper, manganese, selenium and zinc in a Northern Italy community. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018, 50, 508–517.
42. Fischer A., Wiechuła D., Postek-Stefańska L., Kwapuliński J.: Concentrations of metals in maxilla and mandible deciduous and permanent human teeth. *Biological Trace Element Research*, 2009, 132, 19-26.
43. Ford P.J., Rich A.M.: Tobacco use and oral health. *Addiction*, 2021, 116, 3531-3540.
44. Gałążyn-Sidorczuk M., Brzóska M.M., Jurczuk M., Moniuszko-Jakoniuk M.: Oxidative damage to proteins and DNA in rats exposed to cadmium and/or ethanol. *Chemico-Biological Interactions*, 2009, 180, 31-38.
45. Gałążyn-Sidorczuk M., Brzóska M.M., Rogalska J., Roszczenko A., Jurczuk M.: Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2012, 26, 46-52.
46. Gao L., Li X.: Protective Effect of tubotaiwine on cadmium-induced hypertension in rats through reduction in arterial stiffness and vascular remodeling. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2021, 500, 368-375.
47. Gapys B., Raszeja-Specht A., Bielarczyk H.: Rola cynku w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmu. *Diagnostyka Laboratoryjna*, 2014, 50, 45-52.
48. Gaur S., Agnihotri R.: Trace mineral micronutrients and chronic periodontitis-A review. *Biological Trace Element Research*, 2017, 176, 225–238.
49. Genchi G., Sinicropi M.S., Lauria G., Carocci A., Catalano A.: The effects of cadmium toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17, 3782.
50. Geng H.X., Wang L.: Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2019, 67, 102-107.
51. Ghallab N.A.: Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Archives of Oral Biology*, 2018, 87, 115–124.
52. Gholizadeh N., Mehdipour M., Najafi S., Bahramian A., Garjani S., Khoeini Poorfar H.: Evaluation of the serum zinc level in erosive and non-erosive oral lichen planus. *Journal of Dentistry (Shiraz)*, 2014, 15, 52–56.

53. Grioni S., Agnoli C., Krogh V., Pala V., Rinaldi S., Vinceti M., Contiero P., Vescovi L., Malavolti M., Sieri S.: Dietary cadmium and risk of breast cancer subtypes defined by hormone receptor status: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 2019, 144, 2153–2160.
54. Guo L., Lichten L.A., Ryu M.S., Liuzzi J.P., Wang F., Cousins R.J.: STAT5-glucocorticoid receptor interaction and MTF-1 regulate the expression of ZnT2 (Slc30a2) in pancreatic acinar cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107, 2818–2823.
55. Gutteridge J.M.C., Halliwell B.: Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 502, 183–186.
56. Haase H., Ellingerb S., Linseisen J., Neuhäuser-Bertholde M., Richterf M.: Revised D-A-CH-reference values for the intake of zinc. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2020, 61, 126536.
57. He S., Zhuo L., Cao Y., Liu G., Zhao H., Song R., Liu Z.: Effect of cadmium on osteoclast differentiation during bone injury in female mice. *Environmental Toxicology*, 2020, 35, 487–494.
58. Ho E., Wong C.P., King J.C.: Impact of zinc on DNA integrity and age-related inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022, 178, 391–397.
59. Hussein A.M., Hasan S.: Cadmium affects viability of bone marrow mesenchymal stem cells through membrane impairment, intracellular calcium elevation and DNA, breakage. *Indian Journal of Medical Sciences*, 2010, 64, 177–186.
60. IARC (International Agency for Research on Cancer). *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry*. IARC Scientific Publications: Lyon, France, 1993, 119–238.
61. Inaba T., Kobayashi E., Suwazono Y., Uetani M., Oishi M., Nakagawa H., Nogawa K.: Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-Itai disease. *Toxicology Letters*, 2005, 159, 2, 192.
62. Johri N., Jacquillet G., Unwin R.: Heavy metal poisoning: The effects of cadmium on the kidney. *BioMetals*, 2010, 23, 783–792.
63. Julin B., Wolk A., Johansson E., Andersson S.O., Andréén O., Akesson A.: Dietary cadmium exposure and prostate cancer incidence: A population-based prospective cohort study. *British Journal of Cancer*, 2012, 107, 895–900.

64. Kambe T., Tsuji T., Hashimoto A., Itsumura N.: The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiological Reviews*, 2015, 95, 749–784.
65. Kesarwala A.H., Krishna M.C., Mitchell J.B.: Oxidative stress in oral diseases. *Oral Diseases*, 2016, 22, 9–18.
66. Kołodziej U., Maciejczyk M., Miąsko A., Matczuk J., Knaś M., Żukowski P., Żendzian-Piotrowska M., Borys J., Zalewska A.: Oxidative modification in the salivary glands of high fat-diet induced insulin resistant rats. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8, 20.
67. Kołodziej U., Maciejczyk M., Niklińska W., Waszkiel D., Żendzian-Piotrowska M., Żukowski P., Zalewska A.: Chronic high-protein diet induces oxidative stress and alters the salivary gland function in rats. *Archives of Oral Biology*, 2017, 84, 6–12.
68. Kondaiah P., Yaduvanshi P.S., Sharp P.A., Pullakhandam R.: Iron and zinc homeostasis and interactions: does enteric zinc excretion cross-talk with intestinal iron absorption? *Nutrients*, 2019, 11, 1885.
69. Kostecka-Sochoń P., Dąbrowska E.: The Impact of cadmium and/or zinc on specific enzymatic parameters of the antioxidative barrier in sublingual gland in rat. *Dental and Medical Problems*, 2013, 50, 282–290.
70. Kostecka-Sochoń P., Onopiuk B.M., Dąbrowska E.: Protective effect of increased zinc supply against oxidative damage of sublingual salivary gland in chronic exposure to cadmium: Experimental study on rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 3732842.
71. Krifka S., Hiller K.A., Spagnuolo G., Jewett A., Schmalz G., Schweikl H.: The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials*, 2012, 33, 5177-5186.
72. Krysińska A., Wojnar M., Hermanowicz A., Matuszczak E.: The role of saliva in the process of oxidative stress – review of literature. *Journal of Education, Health and Sport*, 2016, 6, 730-738.
73. Kuchta E., Berger M., Trafidło P., Szymańska J.: Wpływ palenia tytoniu na zdrowie jamy ustnej. *Zdrowie Publiczne*, 2013, 123, 87-91.
74. Kumar J., Teoh S.L., Das S., Mahaknaukrah P.: Oxidative stress in oral diseases: Understanding its relation with other systemic diseases. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8, 693.

75. Kumar P., Lal N.R., Mondal A.K., Mondal A., Gharami R.C., Maiti A.: Zinc and skin: a brief summary. *Dermatology Online Journal*, 2012, 18, 1.
76. Kumar S., Sharma A.: Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. *Reviews on Environmental Health*, 2019, 34, 327–338.
77. Labudda M.: Biochemiczne mechanizmy neurotoksyczności kadmu. *Roczniki PZH*, 2011, 62, 357-363.
78. Li J., Yin P., Chen X., Kong X., Zhong W., Ge Y., She Y., Xian X., Qi L., Lin Z., Moe J., Fang S.: Effect of alpha2-macroglobulin in the early stage of jaw osteoradionecrosis. *International Journal of Oncology*, 2020, 57, 213-222.
79. Lv Y., Wang P., Huang R., Liang X., Wang P., Tan J., Chen Z., Dun Z., Wang J., Jiang Q., Wu S., Ling H., Li Z., Yang X.: Cadmium exposure and osteoporosis: a population-based study and benchmark dose estimation in Southern China. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2017, 32, 1990–2000.
80. Lynch R.J.M.: Zinc in the mouth, its interactions with dental enamel and possible effects on caries; a review of the literature. *International Dental Journal*, 2011, 61, 46–54.
81. Łuszczek-Trojnar E., Błoniarz P., Winiarski B., Drąg-Kozak E., Popek W.: Porównanie koncentracji kadmu, cynku, manganu i niklu w filetach wybranych gatunków ryb konsumpcyjnych. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 2015, 11, 75-84.
82. Ma Y., Ran D., Shi X., Zhao H., Liu Z.: Cadmium toxicity: A role in bone cell function and teeth development. *Science of the Total Environment*, 2021, 769, 144646.
83. Madrigal J.M., Ricardo A.C., Persky V., Turyk M.: Associations between blood cadmium concentration and kidney function in the U.S. population: impact of sex, diabetes and hypertension. *Environmental Research*, 2019, 169, 180-188.
84. Malara P., Fischer A., Malara B.: Selected toxic and essential heavy metals in impacted teeth and the surrounding mandibular bones of people exposed to heavy metals in the environment. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2016, 11, 56.
85. Malekpouri P., Moshtaghi A.A., Kazemian M., Soltani M.: Protective effect of zinc on related parameters to bone metabolism in common carp fish (*Cyprinus carpio* L.) intoxicated with cadmium. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37, 187–196.

86. Maret W.: The redox biology of redox-inert zinc ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 134, 311–326.
87. Marreiro D.D.N., Cruz K.J.C., Morais J.B.S., Beserra J.B., Severo J.S., de Oliveira A.R.S.: Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants*, 2017, 6, 24.
88. McMahon M., Lamont D.J., Beattie K.A., Hayes J.D.: Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107, 18838–18843.
89. Mehdipour M., Taghavi Zenooz A., Sohrabi A., Gholizadeh N., Bahramian A., Jamali Z.: A comparison of the effect of triamcinolone ointment and mouthwash with or without zinc on the healing process of aphthous stomatitis lesions. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 2016, 10, 87–91.
90. Mehranjani M.S., Mosavi M.: Cadmium chloride toxicity suppresses osteogenic potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells through reducing cell viability and bone matrix mineralization. *Indian Journal of Medical Sciences*, 2011, 65, 157–167.
91. Meshkini A.: A correlation between intracellular zinc content and osteosarcoma. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199, 3222–3231.
92. Mężyńska M., Brzóska M.M.: Environmental exposure to cadmium – a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25, 3211-3232.
93. Mężyńska M., Brzóska M.M., Rogalska J., Galicka A.: Extract from *Aronia melanocarpa* L. berries protects against cadmium-induced lipid peroxidation and oxidative damage to proteins and DNA in the liver: a study in a rat model of environmental human exposure to this xenobiotic. *Nutrients*, 2019, 11, 758.
94. Milnerowicz H., Sciskalska M., Dul M.: Pro-inflammatory effects of metals in persons and animals exposed to tobacco smoke. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015, 29, 1-10.
95. Mona T., Heba M.A., Eman S., Khadiga S.I., Safaa E.: Impact of occupational cadmium exposure on bone in sewage workers. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 2018, 24, 101–108.
96. Mońka I., Wiechuła D.: Znaczenie cynku dla organizmu ludzkiego w aspekcie suplementacji tego pierwiastka. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*, 2017, 71, 314-325.

97. Muniz F.W.M.G., Nogueira S.B., Mendes F.L.V., Rosing C.K., Moreira M.M.S.M., de Andrade G.M., Carvalho Rde S.: The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: A systematic review. *Archives of Oral Biology*, 2015, 60, 1203–1214.
98. Ni W., Yang W., Yu J., Li Z., Jin L., Liu J., Zhang Y., Wang L., Ren A.: Association between selected essential trace element concentrations in umbilical cord and risk for cleft lip with or without cleft palate: A case-control study. *Science of the Total Environment*, 2019, 661, 196–202.
99. Nizet A., Cavalier E., Stenvinkel P., Haarhaus M., Magnusson P.: Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease-Mineral and bone disorder. *Clinica Chimica Acta*, 2020, 501, 198–206.
100. Oliveira H., Monteiro C., Pinho F., Pinho S., Ferreira de Oliveira J.M., Santos C.: Cadmium induced genotoxicity in human osteoblast-like cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2014, 775, 38–47.
101. Orr S.E., Bridges C.C.: Chronic kidney disease and exposure to nephrotoxic metals. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18, 1039, 28498320.
102. Paithankar J.G., Saini S., Dwivedi S., Sharma A., Chowdhuri D.K.: Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. *Chemosphere*, 2021, 262, 128350.
103. Pakulska D., Czerczak S.: Zagrożenia zdrowotne wynikające z narażenia na cynk i jego związki nieorganiczne w przemyśle. *Medycyna Pracy*, 2017, 68, 779-794.
104. Plum L.M., Rink L., Haase H.: The essential toxin: impact of zinc on human health. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 2010, 7, 1342-1365.
105. Prozialeck W.C., Van Dreel A., Ackerman C.D., Stock I., Papaeliou A., Yasmine C., Wilson K., Lamar P.C., Sears V.L., Gasiorowski J.Z., DiNovo K.M., Vaidya V.S., Edwardset J.R.: Evaluation of cystatin C as an early biomarker of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Biometals*, 2016, 29, 131–146.
106. Rafati Rahimzadeh M., Rafati Rahimzadeh M., Kazemi S., Moghadamnia A.A.: Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 2017, 8, 135-145.
107. Rathod S., Rathi P., Harkare V.: Trace elements as a diagnostic biomarker for premalignant lesions and malignant conditions. *SRM Journal of Research in Dental Sciences*, 2019, 10, 40–46.

108. Rehman K., Fatima F., Waheed I., Akash M.S.H.: Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119, 157–184.
109. Rodríguez J., Mandalunis P.M.: A review of metal exposure and its effects on bone health. *Journal of Toxicology*, 2018, 4854152.
110. Rodríguez J., Mandalunis P.M.: Effect of cadmium on bone tissue in growing animals. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2016, 68, 391-397. 215.
111. Rogalska J., Brzóška M.M., Roszczenko A., Moniuszko-Jakoniuk J.: Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chemico-Biological Interactions*, 2009, 177, 142-152.
112. Rogalska J., Piłat-Marcinkiewicz B., Brzóška M.M.: Protective effect of zinc against cadmium hepatotoxicity depends on this bioelement intake and level of cadmium exposure: A study in a rat model. *Chemico-Biological Interactions*, 2011, 193, 191-203.
113. Rosing C.K., Cavagni J., Gaio E.J., Muniz F., Ranzan N., Oballe H.J.R., Friedrich S.A., Severo R.M., Stewart B., Zhang Y.P.: Efficacy of two mouthwashes with cetylpyridinium chloride: A controlled randomized clinical trial. *Brazilian Oral Research*, 2017, 31, e47.
114. Ruttkay-Nedecky B., Nejdil L., Gumulec J., Zitka O., Masarik M., Eckschlager T., Stiborova M., Adam V., Kizek R.: The role of metallothionein in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14, 6044–6066.
115. Sabolić I., Breljak D., Skarica M., Herak-Kramberger C.M.: Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 2010, 23, 897-926.
116. Sachdev P.K., Freeland-Graves J., Beretvas S.N., Sanjeevi N.: Zinc, copper, and iron in oral submucous fibrosis: A meta-analysis. *International Journal of Dentistry*, 2018, 2018, 3472087.
117. Şahin E., Gümüşlü S.: Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry Physiology, Part C*, 2007, 144, 342–347.
118. Sakulsak N.: Metallothionein: An overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *International Journal of Morphology*, 2012, 30, 1007–1012.
119. Sandstead H.H., Prasad A.S.: Zinc intake and resistance to H1N1 influenza. *American Journal of Public Health*, 2010, 100, 970–971.

120. Sardaro N., Vella F.D., Incalza M.A., Di Stasio D., Lucchese A., Contaldo M., Laudadio C., Petruzzi M.: Oxidative stress and oral mucosal diseases: An overview. *In Vivo*, 2019, 33, 289-296.
121. Satarug S.: Dietary cadmium intake and its effects on kidneys. *Toxics*, 2018, 6, 15.
122. Satarug S., Vesey D.A., Gobe G.C.: Current health risk assessment practice for dietary cadmium: data from different countries. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 106, 430-445.
123. Satarug S., Vesey D.A., Gobe G.C.: Health risk assessment of dietary cadmium intake: do current guidelines indicate how much is safe? *Environmental Health Perspectives*, 2017, 125, 284-288.
124. Savasky B.M., Mascotti D.P., Patel N., Rodriguez-Collazo E.: Nutritional and pharmacological effects on oxidative stress in soft tissue and bone remodeling. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2018, 4183407.
125. Schwartz M., Neiers F., Feron G., Canon F.: The relationship between salivary redox, diet, and food flavor perception. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 7, Article 612735.
126. Schweikl H., Spagnuolo G., Schmalz G.: Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of Dental Research*, 2006, 85, 870-877.
127. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA Journal*, 2014, 12, 3844.
128. Seyedmajidi S.A., Seyedmajidi M., Moghadamnia A., Khani Z., Zahedpasha S., Jenabian N., Jorsaraei G., Halalkhor S., Motallebnejad M.: Effect of zinc-deficient diet on oral tissues and periodontal indices in rats. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2014, 3, 81-87.
129. Sharma P., Kumar Reddy P., Kumar B.: Trace element zinc, a nature's gift to fight unprecedented global pandemic COVID-19. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199, 3213-3221.
130. Skalny A.V., Rink L., Ajsuvakova O.P., Aschner M., Gritsenko V.A., Alekseenko S.I., Svistunov A.A., Petrakis D., Spandidos D.A., Aaseth J., Tsatsakis A.: Zinc and respiratory tract infections: perspectives for COVID-19. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 46, 17-26.
131. Skrajnowska D., Bobrowska-Korczak B.: Role of zinc in immune system and anti-cancer defense mechanisms. *Nutrients*, 2019, 11, 2273.

132. Śliwiński T., Czechowska A., Kolodziejczak M., Jajte J., Wisniewska-Jarosinska M., Blasiak J.: Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells. *Cell Biology International*, 2009, 33, 542–547.
133. Słotwińska S.M., Majkowski M.: Wybielanie zębów a środowisko jamy ustnej. *Nowa Stomatologia*, 2011, 3, 115-118.
134. Sorkina O., Zaitseva O., Khudyakov A.: The effect of long-term alcohol intoxication on the morphological structures and enzymatic activity of rat salivary glands. *Alcohol*, 2021, 99, 23-33.
135. Spalj S., Mlacovic Zrinski M., Tudor Spalj V., Ivankovic Buljan Z.: In-vitro assessment of oxidative stress generated by orthodontic archwires. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2012, 141, 583-589.
136. Suzuki M., Suzuki T., Watanabe M., Hatakeyama S., Kimura S., Nakazono A., Honma A., Nakamaru Y., Vreugde S., Homma A.: Role of intracellular zinc in molecular and cellular function in allergic inflammatory diseases. *Allergology International*, 2021, 70, 190-200.
137. Suzuki R., Fujiwara Y., Saito M., Arakawa S., Shirakawa J.I., Yamanaka M., Komohara Y., Marumo K., Nagaiet R.: Intracellular accumulation of advanced glycation end-products induces osteoblast apoptosis via endoplasmic reticulum stress. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2020, 35, 1992-2003.
138. Suzuki Y., Tada-Oikawa S., Ichihara G., Yabata M., Izuoka K., Suzuki M., Sakai K., Ichihara S.: Zinc oxide nanoparticles induce migration and adhesion of monocytes to endothelial cells and accelerate foam cell formation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 278, 16–25.
139. Świetlicka I., Tomaszewska E., Muszyński S., Valverde Piedra J., Świetlicki M., Prószyński A., Cieślak K., Wiącek D., Szymańczyk S., Kamiński D.: The effect of cadmium exposition on the structure and mechanical properties of rat incisors. *PLoS One*, 2019, 14, e0215370.
140. Tian Y., Ma X., Yang C., Su P., Yin C., Qian A.R.: The impact of oxidative stress on the bone system in response to the space special environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18, 2132.
141. Tothova L., Celec P.: Oxidative stress and antioxidants in the diagnosis and therapy of periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8, 1055.
142. Tothova L., Kamodyova N., Cervenka T., Celec P.: Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5, 73.

143. Umair M., Alfadhel M.: Genetic disorders associated with metal metabolism. *Cells* 2019, 8, 1598.
144. Uwagie-Ero E.A., Abiaezute C.N., Nwaehujor C.O., Nnaji T.O., Odigie E.A., Ekeolu O.K., Ocheja O.B.: Osteocyte viability and bone density in cadmium chloride-induced osteoporosis ameliorated with *Pilostigma thonningii* stem bark-extracted D-3-O-methy-chiroinositol *Animal Models and Experimental Medicine*, 2019, 2, 25–33.
145. Uwitonze A.M., Ojeh N., Murererehe M., Atfi A., Razzaque M.S.: Zinc adequacy is essential for the maintenance of optimal oral health. *Nutrients*, 2020, 12, 949.
146. Vickram S., Rohini K., Srinivasan S., Veenakumari D.N., Archana K., Anbarasu K., Jeyanthi P., Thanigaiavel S., Gulothungan G., Rajendiran N., Srikumaret P.S.: Role of zinc (Zn) in human reproduction: a journey from initial spermatogenesis to childbirth. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 2188.
147. Wallin M., Barregard L., Sallsten G., Lundh T., Karlsson M.K., Lorentzon M., Ohlsson C., Mellström D.: Low-level cadmium exposure is associated with decreased bone mineral density and increased risk of incident fractures in elderly men: the MrOS Sweden study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2016, 31, 732-741.
148. Wallin M., Barregard L., Sallsten G., Lundh T., Sundh D., Lorentzon M., Ohlsson C., Mellström D.: Low-level cadmium exposure is associated with decreased cortical thickness, cortical area and trabecular bone volume fraction in elderly men: The MrOS Sweden study. *Bone*, 2021, 43, 115768.
149. Wallin M., Sallsten G., Lundh T., Barregard L.: Low-level cadmium exposure and effects on kidney function. *Occupational and Environmental Medicine*, 2014, 71, 848.
150. Wang M., Chen Z., Song W., Hong D., Huang L., Li Y.: A review on cadmium exposure in the population and intervention strategies against cadmium toxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021, 106, 65–74.
151. Wang Y., Andrukhov O., Rausch-Fan X.: Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8, 910.
152. Wessels I., Maywald M., Rink L.: Zinc as a gatekeeper of immune function. *Nutrients*, 2017, 9, 1286.
153. Wu E.W., Schaumberg D.A., Park S.K.: Environmental cadmium and lead exposures and age-related macular degeneration in U.S. adults: the National Health and

- Nutrition Examination Survey 2005 to 2008. *Environmental Research*, 2014, 133, 178-184.
154. Wychowanski P., Malkiewicz K.: Evaluation of metal ion concentration in hard tissues of teeth in residents of central Poland. *BioMed Research International*, 2017, 2017, 6419709.
 155. Yadav A., Kumar L., Misra N., Deepak U., Shiv Kumar G.C.: Estimation of serum zinc, copper, and iron in the patients of oral submucous fibrosis. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 2015, 6, 190–193.
 156. Yan L-J., Allen D.C.: Cadmium-induced kidney injury: oxidative damage as a unifying mechanism. *Biomolecules*, 2021, 11, 1575.
 157. Yang H., Shu Y.: Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 1484-1494.
 158. Yang Y., Cheng R., Liu J., Fang J., Wang X., Cui Y., Zhang P., Du B.: Linarin protects against cadmium-induced osteoporosis via reducing oxidative stress and inflammation and altering RANK/RANKL/OPG pathway. *Biological Trace Element Research*, 2021, 200(8), 3688-3700.
 159. Yessica Eduvigis Z.C., Martínez-Nava G., Reyes-Hinojosa D., Mendoza-Soto L., Fernández-Torres J., López-Reyes A., Olivos-Meza A., Armienta-Hernández M.A., Ruíz-Huerta E.A., de Jesús González-Guadarrama M., Sandoval B.V., Landa-Solís C., Sánchez-Sánchez R., Suarez-Ahedo C., Lozada-Pérez C.A., Gutiérrez-Ruiz M.C., Clavijo-Cornejo D., Pineda C., Jacobo-Albavera L., Domínguez-Pérez M., Martínez-Flores K.: Impact of cadmium toxicity on cartilage loss in a 3D in vitro model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020, 74, 103307.
 160. Yildirimyan N., Ozalp O., Satir S., Altay M.A., Sindel A.: Recurrent aphthous stomatitis as a result of zinc deficiency. *Oral Health and Preventive Dentistry*, 2019, 17, 465–468.
 161. Yin Y., Xue X., Wang Q., Chen N., Miao D.: Bmi1 plays an important role in dentin and mandible homeostasis by maintaining redox balance. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8, 4716-4725.
 162. Yoshino F., Yoshida A., Okada E., Okada Y., Maehata Y., Miyamoto C., Kishimoto S., Otsuka T., Nishimura T., Lee M.C.: Dental resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen species production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012, 1, 73–78.

163. Yu H.Y., Zhen J., Leng J.Y., Cai L., Ji H.L., Keller B.B.: Zinc as a countermeasure for Cd toxicity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, 42(3), 340-346.
164. Zalewska A., Knaś M., Gińdzieńska-Sieśkiewicz E., Waszkiewicz N., Klimiuk A., Litwin K., Sierakowski S., Waszkiel D.: Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2014, 43, 61-68.
165. Zalewska A., Knaś M., Kuźmiuk A., Waszkiewicz N., Niczyporuk M., Waszkiel D., Zwierz K.: Salivary innate defense system in type 1 diabetes mellitus in children with mixed and permanent dentition. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013, 71, 1493-1500.
166. Zalewska A., Ziembicka D., Żendzian-Piotrowska M., Maciejczyk M.: The impact of high-fat diet on mitochondrial function, free radical production, and nitrosative stress in the salivary glands of Wistar rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019, 2606120.
167. Zhang L., Liu Y.: Potential interventions for novel coronavirus in China: a systematic review. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92, 479–490.
168. Zhang Q., Zhang H.X., Chen Y., Wang Y., Yang M., Guo M.: Zinc deficiency induces oxidative damage and causes spleen fibrosis. *Biological Trace Element Research*, 2020, 194, 203–209.
169. Zhang Y., He J., He B., Huang R., Li M.: Effect of tobacco on periodontal disease and oral cancer. *Tobacco Induced Diseases*, 2019; 17, 40.
170. Zhang Y., Tian Y., Zhang H., Xu B., Chen H.: Potential pathways of zinc deficiency-promoted tumorigenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 133, 110983.
171. Zhao H., Liu W., Wang Y., Dai N., Gu J., Yuan Y., Liu X., Bian Y., Liu Z.P.: Cadmium induces apoptosis in primary rat osteoblasts through caspase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Veterinary Science*, 2015, 16, 297–306.
172. Zhu Y., Costa M.: Metals and molecular carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2020, 41, 9, 1161–1172.
173. Zimta A.A., Schitcu V., Gurzau E., Stavaru C., Manda G., Szedlacsek S., Berindan-Neagoe I.: Biological and molecular modifications induced by cadmium and arsenic during breast and prostate cancer development. *Environmental Research*, 2019, 178, 108700.
174. Zwolak I.: The role of selenium in arsenic and cadmium toxicity: an updated review of scientific literature. *Biological Trace Element Research*, 2020, 193, 44–63.

175. Zofkova I., Davis M., Blahos J.: Trace elements have beneficial, as well as detrimental effects on bone homeostasis. *Physiological Research*, 2017, 66, 391–402.
176. Żukowski P., Maciejczyk M., Matczuk J., Kurek K., Waszkiel D., Żendzian-Piotrowska M., Zalewska A.: Effect of N-acetylcysteine on antioxidant defense, oxidative modification, and salivary gland function in a rat model of insulin resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2018, 6581970.
177. Żukowski P., Maciejczyk M., Waszkiel D.: Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 2018, 92, 8–17.

XI. Wykaz tabel

Tabela I Wpływ kadmu i/lub cynku na stężenie tych metali w tkance kostnej żuchwy.....	55
Tabela II. Wpływ kadmu i/lub cynku na aktywność SOD, CAT, GPx i GR w tkance kostnej żuchwy.....	58
Tabela III. Wpływ kadmu i/lub cynku na stężenie DNA/RNA, PC, LPO i H ₂ O ₂ w tkance kostnej żuchwy.	63
Tabela IV. Wpływ cynku i /lub kadmu na stężenie TOS, TAS i OSI w tkance kostnej żuchwy.	68
Tabela V. Korelacje Pearsona pomiędzy stężeniem Zn i Cd a wskaźnikami stanu oksydacyjno-redukcyjnego.	73

XII. Wykaz rycin

Rycina 1. Mechanizmy działania toksycznego kadmu [27].....	11
Rycina 2. Udział kadmu w indukcji stresu oksydacyjnego [27].....	12
Rycina 3. Mechanizmy wpływu kadmu na kości - opracowanie własne na podstawie [20, 26, 82, 137, 147, 148].	17
Rycina 4. Porównanie skutków zatrucia z niedoborem cynku w organizmie.....	27
Rycina 5. Schemat modelu doświadczalnego z uwzględnieniem wykonanych badań.....	39
Rycina 6. Kość żuchwy szczura (pobrana w trakcie doświadczenia).....	40
Rycina 7. Stężenie cynku ($\mu\text{g/g}$ tkanki) w tkance kostnej żuchwy szczurów.	56
Rycina 8. Stężenie kadmu ($\mu\text{g/g}$ tkanki) w tkance kostnej żuchwy szczurów.	57
Rycina 9. Aktywność GPx (mU/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.....	59
Rycina 10. Aktywność SOD (U/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.....	60
Rycina 11. Aktywność CAT ($\text{mmol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$ białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.....	61
Rycina 12. Aktywność GR (mU/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.	62
Rycina 13. Stężenie DNA/RNA (pg/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.	64
Rycina 14. Stężenie PC (nmol/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.	65
Rycina 15. Stężenie LPO ($\mu\text{M/g}$ białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.	66
Rycina 16. Stężenie H_2O_2 (nmol/mg białka) w tkance kostnej żuchwy szczurów.....	67
Rycina 17. Stężenie TOS (nmol/mg białka) w tkance kostnej żuchwy.....	69
Rycina 18. Stężenie TAS (nmol/mg białka) w tkance kostnej żuchwy.....	70
Rycina 19. Stosunek TOS/TAS (OSI) w tkance kostnej żuchwy.....	71

XIII. Zgoda Komisji Etycznej i Kierownika Zakładu, w którym przeprowadzone zostały badania.

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
w Białymstoku
ZAKŁAD FIZJOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
AKADEMIA MEDYCZNA
15-050 Białystok, ul. Mickiewicza 2A
tel./fax (0-85) 748 58 99

Nr opinii	2004/03
Data	2004-02-25
Nr wniosku	2004/03
Data	2004-01-26

OPINIA LOKALNEJ KOMISJI ETYCZNEJ

(Kopia wniosku jest integralną częścią opinii)

Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku rozpatrzyła na posiedzeniu w dniu 25.02.2004 r. wniosek o realizację projektu p.t.:

Ocena wpływu suplementacji cynkiem na stan kości szczurów po długotrwałym narażeniu na kadm stanowiącym odpowiednik ekspozycji zawodowej i środowiskowej człowieka.

złożony przez Dr n. med. Elżbietę Kulikowską - Karpińską

zatrudnioną w Zakładzie Toksykologii Akademii Medycznej w Białymstoku

i uznała realizację tego projektu za:

dopuszczalną (D)

niedopuszczalną (N)

Ustalono, że:

1. Doświadczenia należy zaliczyć do kategorii:

- badania na żywych kręgowcach
- testy na żywych kręgowcach
- doświadczenia na żywych kręgowcach dla celów dydaktycznych

2. Najwyższa wartość stopnia inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza 2

3. Doświadczenia mogą być wykonywane na zwierzętach

Lp.	Gatunek	Liczba zwierząt
1)	Szczur Wistar	200

Szczegółowe uzasadnienie

Projekt nie budzi zastrzeżeń pod względem celowości jego wykonania (zostało to szczegółowo uzasadnione), ilości użytych zwierząt oraz samej procedury przeprowadzenia doświadczeń. Komisja Etyczna wyraża zgodę na realizację projektu. Niniejsza opinia została wystawiona na okres 01.10.2004 - 30.09.2006 i dotyczy 200 szczurów w tym 200 szt. o stopniu inwazyjności 2.

Odwolanie od niniejszej opinii do KKE w Warszawie przysługuje kierownikowi jednostki i wnioskodawcy. Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji, która wydała opinię, w terminie jednego miesiąca od dnia otrzymania tej opinii (Dz. U. Nr 38 poz. 361 art. 30 z dnia 21 kwietnia 1999r.).

Miejsce: Białystok
Data: 2004-02-25

PRZEWODNICZĄCA
Lokalne Komisji Etycznej
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
w Białymstoku
Barbara Malinowska
prof. dr hab. Barbara Malinowska



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Zakład Toksykologii

ul. Mickiewicza 2 C, 15-222 Białystok

Tel./fax: (85) 748 56 04

e-mail: toxic@umb.edu.pl

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Małgorzata M. Brzóska

Białystok, 08.06.2022

Niniejszym wyrażam zgodę na wykorzystanie materiału biologicznego (kości zuchwy szczurów) pobranego i zabezpieczonego podczas doświadczenia na zwierzętach prowadzonego w Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pt. „Ocena wpływu suplementacji cynkiem na stan kości szczurów po długotrwałym narażeniu na kadm stanowiącym odpowiednik ekspozycji zawodowej i środowiskowej człowieka”, na które uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku nr 2004/03, do realizacji pracy doktorskiej lek. dent. Kamila Bijowskiego przygotowywanej pod kierunkiem dr hab. Ewy Dąbrowskiej.

KIEROWNIK
Zakładu Toksykologii

prof. dr hab. Małgorzata M. Brzóska