

MARTA B. KACZOR

(UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI)

ZMIANY ZACHODZĄCE W ORGANIZMIE PŁAZÓW POD WPŁYWEM JONÓW OŁOWIU

1. TOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW OŁOWIU A ORGANIZMY ŻYWE

Ołów należy do grupy metali ciężkich niemających znaczenia w prawidłowym przebiegu procesów metabolicznych w komórce. Jest uważany przez badaczy (biologów, chemików i lekarzy klinicystów) za jedną z najbardziej niebezpiecznych trucizn¹. Do organizmów zarówno zwierzęcych, jak i ludzkich ołów może się przedostawać przez powłoki skórne oraz układ pokarmowy i oddechowy, z których niemalże w całości trafia do krwi, łącząc się z białkami osocza, i transportowany jest do wszystkich tkanek. Odkłada się w kościach i tkankach miękkich. Do narządów, które szczególnie narażone są na działanie ołowiu, należy zaliczyć wątrobę, nerki, szpik kostny oraz mózg². Bardzo niewielki procent z zaabsorbowanego ołowiu ulega wydaleniu³.

Ołów w organizmie tworzy toksyczne złogi, wywołując liczne dolegliwości i choroby. Przewlekłe oddziaływanie na organizm niskich dawek ołowiu prowadzi do wystąpienia wielu neurologicznych, hepatologicznych, rozrodczych i żołądkowo-jelitowych patologii⁴. W kościach ołów ulega akumulacji w postaci

¹ A. Kowalak, *Metale śmierci*, Krosno 1991; S. J. Stohs, D. Bagchi, *Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions*, „Free Radial Biology & Medicine” 1995, nr 18.

² L. Patric, *Lead toxicity, a review of the literature. Part I: exposure, evaluation and treatment*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11.

³ I. Barabowska-Bosiacka, D. Chlubek, *Biochemiczne mechanizmy neurotoksycznego działania ołowiu*, „Postępy Biochemii” 2006, nr 52; L. Patric, *Lead toxicity...*, op. cit.

⁴ L. Patric, *Lead Toxicity Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in pathology and treatment of lead toxicity*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11; D. Quig, *Cysteine Metabolism and Metal Toxicity*, „Alternative Medicine Review” 1998, nr 3.

związków koloidalnych i krystalicznych, natomiast nagromadzony w tkankach miękkich, stanowi tzw. pulę szybko wymienną⁵. Początkowo nie powoduje on zatrucia, ale przejście między stanem nietoksyczności a zmianami patologicznymi jest stopniowe, dlatego tak trudno ustalić jednoznaczną granicę różnicującą stężenia jeszcze nieszkodliwe i już toksyczne. Trudno mówić o braku szkodliwości nawet relatywnie małej dawki ołowiu zaabsorbowanej przez organizm, ponieważ już minimalne jego ilości powodują zaburzenia metabolizmu komórkowego znacznie wcześniej, niż pojawiają się objawy ogólnoustrojowe⁶.

Ze względu na obecność ołowiu w środowisku pojawia się problem dotyczący szkodliwego wpływu jego małych dawek na organizm podczas chronicznej ekspozycji. Przyjmuje się, że istnieje ścisły związek pomiędzy jego zawartością w środowisku a czasem kontaktu tego metalu z organizmem, dlatego też można zaobserwować stopniowy wzrost stężenia Pb z wiekiem w niektórych tkankach⁷. W organizmie każde miejsce zdeponowania ołowiu posiada własny charakterystyczny czas połowicznego okresu jego eliminacji. Dlatego pomimo krótkiego okresu półtrwania we krwi stężenie ołowiu w innych tkankach może przez dłuższy czas utrzymywać się na wysokim poziomie, nawet w przypadku czasowego ustania ekspozycji⁸.

Mechanizmy toksycznego działania jonów metali ciężkich są złożone. Metale ciężkie wykazują wysokie powinowactwo do grup tiolowych, histydylowych, aminowych i karboksylowych białek, a możliwość bezpośredniego wiązania się z nimi prowadzi do zmiany ich struktury i właściwości katalitycznych⁹. Ołów wiąże się z grupami tiolowymi enzymów kluczowych dla syntezy hemu, co w rezultacie hamuje jego syntezę¹⁰. Oddziaływanie ołowiu prowadzi także do zmiany stężenia niskocząsteczkowych tioli oraz zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych – dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy i peroksydazy glutationu. Te zmiany towarzyszą wzrostowi poziomu reaktywnych form tlenu, które mogą prowadzić do stanów zapalnych śródbłonna naczyń, uszkadzają kwasy nukleinowe i hamują naprawę DNA oraz inicjują peroksydację lipidów błon komórkowych¹¹. Proces ten modyfikuje strukturę błon i zakłóca w znacz-

⁵ H. Martynowicz, R. Andrzejak, M. Mędraś, *Wpływ ołowiu na funkcje gonad męskich*, „Medycyna Pracy” 2005, nr 56.

⁶ I. Barabowska-Bosiacka, D. Chlubek, op. cit.

⁷ L. Patric, *Lead toxicity, a review...*, op. cit.; A. Skoczyńska, R. Poręba, A. Sieradzki, R. Andrzejak, U. Sieradzka, *Wpływ ołowiu i kadmu na funkcje układu immunologicznego*, „Medycyna Pracy” 2002, nr 53.

⁸ I. Barabowska-Bosiacka, D. Chlubek, op. cit.

⁹ S. S. Sharma, K. J. Dietz, *The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance*, „Trends in Plant Science” 2009, nr 14.

¹⁰ L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

¹¹ D. Fragou, A. Fragou, S. Kouidou, S. Njau, L. Kovatsi, *Epigenetic mechanism in metal toxicity*, „Toxicology Mechanism and Methods” 2011, nr 21; L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

nym stopniu funkcje mitochondriów¹². Inną przyczyną wysokiej toksyczności ołowiu jest jego współzawodnictwo z dwuwartościowymi kationami metali (np. jonem miedzi lub cynku) o miejsca wiążące w białkach (SOD, syntaza porfobilinogenowa), co prowadzi do zahamowania bądź modyfikacji ich funkcji¹³.

Biorąc pod uwagę wpływ temperatury na negatywne działanie jonów metali ciężkich, możemy wyróżnić dwa podstawowe typy toksyczności. Pierwszym z nich jest niezależna od temperatury odpowiedź na wzrost toksyczności (odpowiedź organizmu pozostaje jednakowa zarówno w niskiej, jak i wysokiej temperaturze) oraz odpowiedź zależna od zmiany temperatury, gdzie obserwujemy wzrost toksycznego działania metali wraz ze wzrostem temperatury otoczenia. Wciąż jednak istnieje pytanie, czy efekt, jaki wywiera temperatura, jest powiązany z metabolizmem toksyn, czy też z innymi procesami fizjologicznymi¹⁴.

Narażenie płazów na obecność chemicznych czynników teratogennych prowadzi do widocznej deformacji ciała żab¹⁵, wad rozwojowych zarodków i larw¹⁶, zmian układu lokomotorycznego w procesie metamorfozy¹⁷, jak również zmian behawioralnych¹⁸. Niekorzystne warunki środowiskowe powodują obniżenie przeżywalności młodych żab po metamorfozie, zmniejszenie rozmiaru ciała, pogorszenie kondycji oraz szybkości pływania. Powoduje to, że stają się one łatwą ofiarą dla atakujących je drapieżników¹⁹. Birdsall i współpracownicy (1986)²⁰ oraz Rowe z zespołem (2001)²¹ sugerują, że kontakt z niewielkimi stężeniami jonów metali ciężkich we wczesnych fazach rozwojowych przyczynia się do wyginięcia populacji.

¹² M. Valko, H. Morris, M. T. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*, „Current Medicinal Chemistry” 2005, nr 12.

¹³ S. S. Sharma, K.J. Dietz, op. cit.

¹⁴ M. C. Newman, M.A. Unger, *Fundamentals of Ecotoxicology*, Boca Raton 2003.

¹⁵ N. S. Lombourdis, D. Wray, *Heavy-metal concentration in the frog Rana ridibunda from a small river of Macedonia, Northern Greece*, „Environmental International” 1998, nr 24.

¹⁶ J. M. Sobotka, R. G. Radwan, *Teratogenesis induced by short – and long-term exposure of Xenopus laevis progeny to lead*, „Journal of Toxicology and Environmental Health” 1995, nr 44.

¹⁷ G. M. Williams, M. J. Iatropoulos, *Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity*, „Toxicologic Pathology” 2002, nr 30.

¹⁸ C. W. Steele, S. Stickler-Shaw, D. H. Taylor, *Failure of Bufo americanus tadpoles to avoid lead-enriched water*, „Journal of Herpetology” 1991, nr 25.

¹⁹ J. E. Houlihan, C. S. Findlay, B. R. Schmidt, A. H. Meyer, S. L. Kuzmin, *Quantitative evidence for global amphibian population declines*, „Nature” 2000, nr 404; R. Mann, J. Bidwell, *Toxicological issues for amphibians in Australia*, [w:] *Declines and Disappearances of Australian Frogs*, ed. A. Campbell, Canberra 1999, s. 185–201.

²⁰ C. W. Birdsall, C. E. Grue, A. Anderson, *Lead contamination in bullfrog Rana catesbeiana and green frog R. clamitans tadpoles inhabiting highway drainages*, „Environmental Pollution” 1986, nr 40A.

²¹ C. L. Rowe, W. A. Hopkins, V.R. Coffman, *Failed recruitment of Southern toads (Bufo terrestris) in trace element-contaminated breeding habitat: direct and indirect effect that may lead to a local population sink*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2003, nr 40.

2. BIOMARKERY TOKSYCZNOŚCI OŁOWIU

Z ekologicznego punktu widzenia wpływ, jaki wywiera zanieczyszczone łożyskiem środowisko naturalne na płazy, jest złożony, a oznaczenie stężenia tego metalu w organizmach gatunków wolno żyjących może odzwierciedlać ekotoksikologiczną historię środowiska ich bytowania. Płazy, jako zwierzęta niemi-grujące, są dobrym modelem badawczym, a badania analityczne mogą odzwierciedlać typowy charakter badanej populacji. Poziom wybranych parametrów w organizmach płazów może być biomarkerem lokalnego nasilenia skażenia środowiska.

2.1. UKŁAD KRWIONOSNY

2.1.1. Liczba krwinek

Wyniki pomiarów liczby krwinek, wykonanych niezależnie przez różnych autorów dla ropuchy z gatunku *Bufo arenarum*²², są porównywalne z wynikami otrzymanymi dla innych płazów²³. U zwierząt narażonych na działanie łożyskiem całkowita liczba czerwonych krwinek (RBC), białych krwinek (WBC) oraz stopień zróżnicowania leukocytów były zmienione. W ciągu jednego tygodnia, po podaniu pojedynczej dawki równej 100 mg Pb/kg, zaobserwowano znaczne obniżenie liczby czerwonych krwinek i wzrost liczby krwinek białych. Dodatkowo liczba niedojrzałych krwinek białych również znacząco wzrosła²⁴. Chiesa i współpracownicy (2006)²⁵ wykazali w eksperymencie prowadzonym przez ok. 7 tygodni na ropuchach otrzymujących raz w tygodniu zastrzyk z 50mg Pb/kg, że po upływie tego czasu ilość RBC spadła o 34%, podczas gdy liczba WBC wzrosła o 100%. Natomiast wcześniejsze badania, prowadzone przez Perí

²² M. E. Varela, M. E. Sellarés, *Sobre la morfología hemática de Bufo arenarum (Hensel)*, „Review of Society Argent Biology” 1937, nr 13.

²³ R. D. Davic, W. W. Gallati, *Erythrocyte number in three species of northern Appalachian Desmognathus (Amphibia, Urodela, Plethodontidae)*, „Journal of Herpetology” 1979, nr 13; I. Hadji-Azimi, V. Coosemans, C. Canicatti, *Atlas of adult Xenopus laevis laevis hematology*, „Developmental & Comparative Immunology” 1987, nr 11; E. Szubarkowska, Gromysz-Kalkowska K., Wójcik K., *Behavior of the former blond elements in Rana esculenta after repeated contacts of the animals with a therapeutic dose of foschlor*, „Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology” 1990, nr 45.

²⁴ C. E. Rosenberg, N. E. Fink, M. A. Arrieta, A. Salibián, *Effect of lead acetate on the in vitro engulfment and killing capability of the toad (Bufo arenarum) neutrophils*, „Comparative Biochemistry and Physiology” 2003, nr 136C.

²⁵ M. E. Chiesa, C. E. Rosenberg, N. E. Fink, A. Salibián, *Serum protein profile and blood cell counts in adult toads Bufo arenarum (Amphibia: Anura: Bufonidae): Effects of sublethal lead acetate*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2006, nr 50.

i współpracowników w 1998 roku²⁶, polegające na trzytygodniowym obserwowaniu wpływu na organizm płazów pojedynczej dawki ołowiu, równej 1/10 dawki LD50, wykazały, że liczba krążących retikulocytów wzrasta znacząco i wybiórczo, bez istotnych zmian liczbowych pozostałych komórek. W związku z powyższym parametr ten mógłby być miarodajnym biomarkerem hematologicznym, odzwierciedlającym narażenie na działanie ołowiu organizmów *B. arenarum*. Warto też podkreślić, że u dorosłych osobników z tego gatunku najliczniejszą procentowo frakcją leukocytów są limfocyty, a więc podobnie jak w przypadku krwi człowieka. Wzrost liczby WBC pod wpływem działania ołowiu²⁷ może być związany z wywoływaną przez toksyny proliferacją pluripotentnych komórek macierzystych, a to z kolei może być przyczyną obniżenia zróżnicowania krążących komórek. Zjawisko to zależne jest od dawki ołowiu podanej zwierzętom²⁸.

2.1.2. Hematokryt

Hematokryt płazów może stanowić kolejny wartościowy wskaźnik przewlekłego narażenia zwierząt na działanie ołowiu. Arrieta i współpracownicy²⁹ zaobserwowali obniżenie wartości hematokrytu o 57%, po podawaniu ropuchom powtarzalnych dawek ołowiu przez okres 5–6 tygodni. Co ciekawe, nie zaobserwowano zmiany tego parametru po pojedynczym wstrzyknięciu, nawet względnie dużej dawki tego metalu³⁰. Dwie hipotezy mogą wyjaśnić skrócenie czasu półtrwania erytrocytów: 1) zmiany biosyntezy hemu³¹, 2) bezpośredni wpływ ołowiu na skład błon erytrocytów i ich właściwości fizyczne³². Ołów jest najsilniejszym czynnikiem hemolitycznym, może więc powodować niszczenie czerwonych krwinek i prowadzić do hemolizy poprzez generowanie stresu oksydacyjnego – może bezpośrednio wiązać się z fosfatydylocholiną występującą w błonach RBC, prowadząc do obniżenia poziomu fosfolipidów.

²⁶ S. I. Perí, N. E. Fink, A. Salibián, *Hematological parameters in Bufo arenarum injected with sublethal dose of Pb acetate*, „Biomedical and Environmental Sciences” 1998, nr 11.

²⁷ M. E. Chiesa, C. E. Rosenberg, N. E. Fink, A. Salibián, op. cit.

²⁸ N. E. Fink, A. Selibán, *Toxicological studies in adult amphibians: Effects of lead*, „Applied Herpetology” 2005, nr 2.

²⁹ M. A. Arieta, L. Bruzzone, C. Apartin, C. E. Rosenberg, N. E. Fink, A. Salibián, *Bio-sensors of inorganic lead exposure and effect in an adult amphibian*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2004, nr 46.

³⁰ M. A. Arieta, S. I. Perí, C. Apartin, C. E. Rosenberg, N. E. Fink, A. Salibián, *Blood lead concentration and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in adult Bufo arenarum*. „Archives of Physiology and Biochemistry” 2000, nr 108; C. E. Rosenberg, S. I. Per, M. A. Arrieta, N. E. Fink, A. Salibián, *Red blood cell osmotic fragility in Bufo arenarum exposed to Pb*, „Archives of Physiology and Biochemistry” 1998, nr 106.

³¹ L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

³² S. R. V. Raghavan, B. C. Culver, C. Gonik, *Erythrocyte lead-binding protein after occupational exposure*, „Environmental Research” 1980, nr 22.

2.1.3. Aktywność dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego

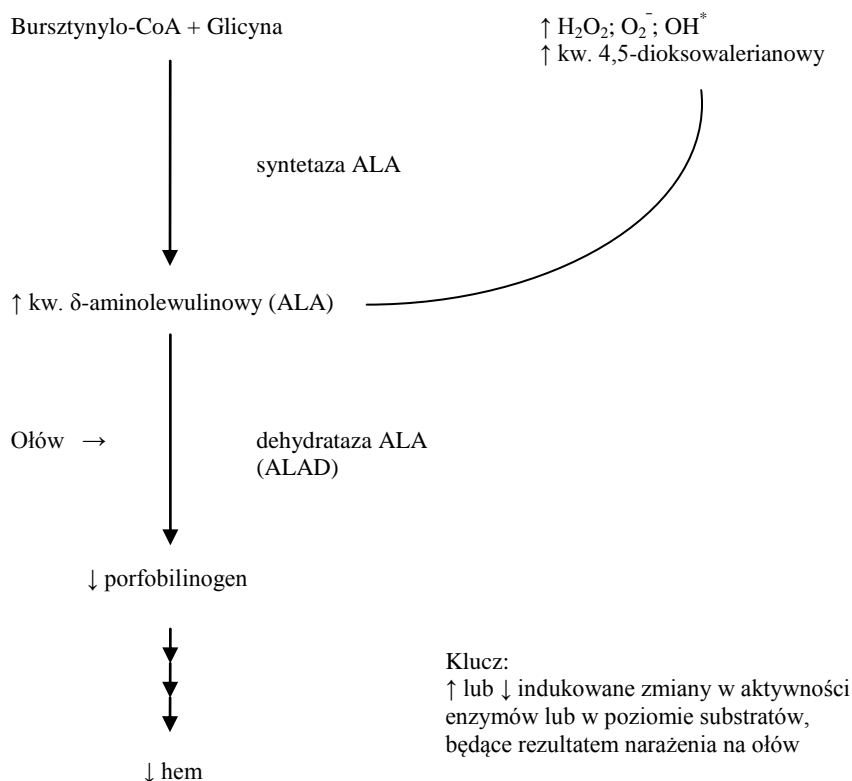
Ołów zaburza szlak syntezy hemu poprzez hamowanie dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego (ALAD). To przyczynia się do podwyższenia poziomu kwasu δ -aminolewulinowego (ALA) i zahamowania jego dalszej przemiany w porfobilinogen. ALA przenika przez barierę krew-mózg i może uszkadzać centralny system nerwowy. Jego neurotoksyczne działanie związane jest z powstawaniem stresu oksydacyjnego i tworzeniem w obecności tlenu (oraz jonów żelaza lub miedzi) rodnika ALA^* i anionorodnika ponadtlennego (O_2^{*-}). Kwas δ -aminolewulinowy wchodzi również w obecności tlenu w reakcje z oksyhemoglobina, w wyniku której powstaje methemoglobina i nadtlenek wodoru (H_2O_2). Dalsze reakcje chemiczne zachodzące pomiędzy produktami prowadzą do wytworzenia rodnika hydroksylowego (OH^*) najbardziej reaktywnego z wolnych rodników (Ryc. 1)³³. ALA może być też utleniany do kwasu 4,5-dioksowalerianowego, potencjalnie genotoksycznego związku, który prowadzi do powstawania mutacji w DNA³⁴. W dalszych etapach biosyntezy hemu ALA powinien być przekształcony do porfobilinogenu, a następnie po reakcjach deaminacji i dekarboksylacji do koproporfirynogenu III. Końcowe reakcje syntezy hemu (utlenianie łańcucha bocznego i dehydrogenacja) również mogą być modyfikowane przez jony ołowiu, który hamuje przyłączanie jonów żelaza do pierścienia protoporfirynowego, a to prowadzi do nagromadzenia żelaza, które na drodze reakcji Fentona bierze udział w tworzeniu groźnych wolnych rodników tlenowych³⁵, może również wiązać się do grup tiolowych ferrochelatazy, uniemożliwiając przekształcenie protoporfiryny IX w hem.

³³ G. H. El-Sokkary, G. H. Abdel-Rahman, E. S. Kamel, *Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats*, "Toxicology" 2005, nr 213; L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

³⁴ Ibidem.

³⁵ A. Boguszewska, K. Pasternak, *Ołów – wpływ na procesy biochemiczne w organizmie ludzkim*, „Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia” 2004, nr 59.

Ryc. 1. Wpływ ołowiu na syntezę hemu



Źródło: L. Patric, *Lead Toxicity Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in pathology and treatment of lead toxicity*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11.

Zakłócenie syntezy hemu (hamowanie ALAD) powoduje wzrost stężenia porfiryń we krwi i obniżenie ilości hemoglobiny³⁶, co połączone z obniżoną liczbą erytrocytów powoduje spadek wartości hematokrytu. Dlatego też wskaźnikiem toksyczności ołowiu może być ilość protoporfiryń uwalnianych w efekcie rozpadu erytrocytów.

³⁶ L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

2.2. UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Układ immunologiczny płazów jest podobny do układu immunologicznego ssaków³⁷, chociaż u niższych kręgowców wydaje się, że jest on bardziej wrażliwy na różne czynniki, takie jak np. sezonowe zmiany temperatury³⁸ czy obecność pestycydów³⁹. Podczas prowadzenia wielu badań na modelach zwierzęcych udowodniono toksyczny wpływ ołowiu na humoralną i komórkową odpowiedź organizmu⁴⁰. Jego działanie immunomodulacyjne zależy od stężenia ołowiu i czasu kontaktu. Wykazano, że poziom ołowiu w środowisku naturalnym wpływa na zmianę funkcji układu immunologicznego. W organizmach ssaków po narażeniu na działanie metalu (zakres stężeń Pb: 1,2 μM –115 μM) *in vitro* i *in vivo* w komórkach z segmentowanym jądrem (PMN) obniżeniu uległa chemotaktyczna i niezależna od receptorów aktywność fagocytarna⁴¹. Zaburzona jest funkcja makrofagów⁴², gdyż ołów, uszkadzając struktury wewnątrzkomórkowe, inaktywuje endotoksyny i hamuje aktywność enzymów z grupą $-\text{SH}$ ⁴³. Bardzo mało wiadomo o skutkach, jakie wywołuje ołów w układzie immunologicznym dorosłych płazów. Rosenberg i współpracownicy (2003)⁴⁴ po podaniu ołowiu (pojedyncza dawka octanu ołowiu, 100 mg/kg) zaobserwowali w komórkach ropuch z gatunku *B. arenarum* spadek aktywności fagocytozy, która była niższa od oznaczonej dla komórek PMN człowieka⁴⁵, ale z kolei aktywność lityczna była wyższa u płazów. Może być to wynikiem wydajniejszego przebiegu procesu litycznego, wynikającego z braku bardziej wyspecjalizowanych mechanizmów, np. takich, jakie obecne są u ssaków. Po zakończonym eksperymencie aktywność fagocytozy była odwrotnie proporcjonalna do stężenia ołowiu we krwi zwierząt⁴⁶.

³⁷ L. A. Rollins-Smith, B. D. Hopkins, L. K. Reinert, *An amphibian model to test effect of xenobiotic chemicals on development of the hematopoietic system*, „Environmental Toxicology & Chemistry” 2004, nr 23.

³⁸ A. G. Zapata, A. Varas, M. Torroba, *Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates*, „Immunology Today” 1992, nr 13.

³⁹ M. K. Gilbertson, G. D. Hafner, K. G. Drouillard, A. Albert, B. Dixon, *Immuno-suppression in the Northern leopard frog (Rana pipiens) induced by pesticide exposure*, „Environmental Toxicology & Chemistry” 2003, nr 22.

⁴⁰ M. J. McCabe, *Lead*, [w:] *Immunotoxicology of Environment and Occupational Metals*, eds. J. T. Zelikoff, P. T. Thomas, London 1998, s. 111–129.

⁴¹ M. Governa, M. Valentino, I. Visona, *In vitro impairment of human granulocyte functions by lead*, „Archives of Toxicology” 1987, nr 6.

⁴² B. Jeremin, B. Bogdanowicz, *Wpływ ołowiu na stan i funkcję układu odpornościowego*, „Wiadomości Lekarskie” 1991, 44 (3/4); M. Wahedi, *Heavy metals-induced autoimmunity: a possible role for lead*, „Central European Journal of Immunology” 2000, nr 25.

⁴³ M. Wahedi, op. cit.

⁴⁴ C. E. Rosenberg, N. E. Fink, M. A. Arrieta, A. Salibián, op. cit.

⁴⁵ E. N. Fink de Cabutti, V. H. Morales, C. Jmelnitzky, J. A. Basualdo Farjat, R. de Torres, *Aspectos inmunológicos en portadores crónicos asintomáticos del HbA_{1c}*, „Sangre” 1984, nr 29.

⁴⁶ C. L. Rowe, W. A. Hopkins, V. R. Coffman, op. cit.

Zmiennocieplne kręgowce wytwarzają przeciwciała podobne w strukturze i różnorodności do przeciwciał wytwarzanych przez ssaki⁴⁷. Płazy są w stanie wytwarzać przeciwciała skierowane przeciwko kilku antygenom, uczestniczącym w odpowiedzi anafilaktycznej oraz w procesie odrzucania przeszczepu⁴⁸. Autoimmunizacja i procesy alergiczne mogą być spowodowane zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej. Obecność naturalnej hemaglutyniny została opisana w osoczu ropuchy z gatunku *Bufo regularis* w 1976 roku⁴⁹. Jurd i współpracownicy (1978)⁵⁰ pokazali, że osocze dorosłych osobników z rodzaju *Xenopus* zawiera naturalny czynnik umożliwiający lizę i aglutynacje RBC z innych gatunków. Fink i Selibàn (2005)⁵¹ przedstawili eksperymentalny dowód na powiązanie wpływu toksyczności ołowiu z indukowaną odpowiedzią immunologiczną. W osoczu dorosłych *B. arenarum* mierzono poziom aglutynin (przeciwciał biorących udział w zlepianiu aglutynogenów podczas aglutynacji) do heterologicznych krwinek czerwonych. Zaobserwowano, że produkcja naturalnych przeciwciał w osoczu ropuch narażonych na działanie ołowiu (50mg Pb/kg *tydzień; przez 6 tygodni) wzrosła o 39% oraz jednocześnie zaobserwowano 142% wzrost stężenia ołowiu we krwi. W grupie zwierząt kontrolnych nie zaobserwowano istotnego statystycznie wzrostu miana przeciwciał, podczas gdy stężenie ołowiu obniżyło się o 49%. Przedstawione wyniki sugerują, że ołów indukuje poprawę współdziaływania limfocytów B i T prowadzący do obserwowanego wzrostu różnicowania limfocytów B⁵².

2.3. FRAKCJA BIAŁEK OSOCZA

Białka surowicy pobrane od *B. arenarum*, po sześciotygodniowym, stałym podawaniu octanu ołowiu w dawce 50 mg/kg, podlegały ocenie profilu białkowego⁵³. Elektroforetyczny rozdział białek surowicy wykazał obecność 4 frakcji – frakcję albuminy i trzy kolejne frakcje globulinowe, oznaczane zgodnie ze wzrastającą masą cząsteczkową jako G1, G2 i G3. Ołów spowodował znaczące obni-

⁴⁷ S. F. Schluter, R. M. Bernstein, J. J. Marchalonis, *Molecular origins ad evolution of immunoglobulin heavy-chain genes of jawed verterbrates*, „Immunology Today” 1997, nr 18.

⁴⁸ L. Du Pasquier, *The immune system of inverterbrates and verterbrates*, „Comparative Biochemistry and Physiology” 2001, nr 129.

⁴⁹ P. Balding, E. R. Gold, *The natural heterohemoagglutinin in the serum of the toad Bufo regularis and its relationship to lower verterbrate immunoglobulins*, „Immunology” 1976, nr 30.

⁵⁰ R. D. Jurd, *A natural heterohaemagglutinin in Xenopus laevis serum*, „Immunology” 1987, nr 34.

⁵¹ N. E. Fink, A. Selibàn, op. cit.

⁵² M. J. McCabe, D. A. Lawrence, *The heavy metal lead exhibits B cell-stimulatory factor by enhancing B cell Ia expression and differentiation*, „Journal of Immunology” 1990, nr 145.

⁵³ F. Bertini, J. M. Cei, *Observaciones electroforéticas en seroproteínas de poblaciones argentinas de Bufo arenarum Hensel*, „Review of Society Argent Biology” 1960, nr 36.

zenie stężenia białka całkowitego i frakcji albuminy. Wśród frakcji globuliny frakcja G3 uległa powiększeniu. Te wyniki można powiązać z wpływem ołowiu na hepatocyty ropuchy, funkcję jej nerek i układu immunologicznego. Chroniczna ekspozycja na działanie ołowiu powoduje niekorzystny wpływ na komórki wątroby, prowadząc do niewydolności funkcjonalnej hepatocytów⁵⁴. Ołów wykazuje działanie nefrotoksyczne, co również może tłumaczyć obserwowane zjawisko obniżenia się stężenia białka całkowitego oraz albuminy. Wyniki te obrazują toksyczny efekt, jaki ołów wywiera na dwa główne organy odpowiedzialne za procesy detoksykacyjne organizmu, tj. wątrobę i nerki.

3. PŁAZY JAKO BIOINDYKATORY

Płazy stanowią bardzo dobry model w badaniach toksykologicznych i ekotoksykologicznych. Organizmy te są bioindykatorami skażenia środowiska⁵⁵. Spowodowane jest to ich dwufazowym cyklem życiowym, obejmującym wodne stadium larwy, która po metamorfozie przybiera dorosłą postać, a ta z kolei może prowadzić życie wodne, wodno-ładowe lub lądowe. Larwy, jako organizmy zależne tylko i wyłącznie od środowiska wodnego, są bardziej wrażliwe na toksyny, szczególnie w początkowych stadiach rozwoju. Relatywnie mały rozmiar płazów i zdolność przystosowania do panujących warunków czyni tę grupę wyjątkowo dogodną do prowadzenia różnych badań laboratoryjnych⁵⁶. Warty zaznaczenia jest fakt, że w zbiornikach słodkowodnych płazy nie piją wody, więc pobieranie ksenobiotyków i toksyn rozpuszczonych w wodzie ograniczone jest tylko i wyłącznie do transportu przez skórę. Duża powierzchnia kontaktu płazów ze środowiskiem zewnętrznym umożliwia transport (aktywny i pasywny) zanieczyszczeń i ksenobiotyków do ich organizmu oraz wymianę gazową i jonową⁵⁷. Co więcej, płazy są kręgowcami zmiennocieplnymi, mającymi szeroki zakres tolerancji termicznej, a słabo wykształcone mechanizmy obronne takiego organizmu są dodatkową zaletą przy projektowaniu i realizacji badań porównawczych, dotyczących przystosowywania się organizmów do różnych, często niekorzystnych warunków środowiskowych.

Obserwowana duża tolerancja płazów na działanie ołowiu może być konsekwencją różnych wyrównawczych zmian zachodzących w ich organizmach,

⁵⁴ G. M. Williams, M. J. Iatropoulos, op. cit.

⁵⁵ L. K. Haywood, G. J. Alexander, M. J. Byrne, E. Cukrowska, *Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium, „African Zoology” 2004, nr 39.

⁵⁶ N. E. Fink, A. Selibàn, op. cit.

⁵⁷ R. G. Boutilier, D. F. Stiffler, D. P. Toews, *Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians*, [w:] *Environmental Physiology of the Amphibians*, eds. M. E. Feder, W. W. Burggren, Chicago 1992; W. W. Burggren, J. J. Just, *Developmental changes in physiological systems*, [w:] *Environmental Physiology of the Amphibians*, eds. M. E. Feder, W. W. Burggren, Chicago 1992.

będących odpowiedzią na stale utrzymujące się, niekorzystne warunki środowiskowe⁵⁸. Genetyczne zmiany w genomie płazów⁵⁹ mogą zwiększać ich szansę na przeżycie poprzez wzrost wydajności procesów metabolicznych odpowiadających za proces detoksykacji metali ciężkich, na przykład poprzez zmianę aktywności i/lub struktury kluczowych enzymów tych szlaków.

Warto również zaznaczyć, że płazy w ich środowisku bytowania nie są narażone selektywnie tylko na jedną toksynę, ale na całą ich gamę. Biorąc tylko pod uwagę niezurbanizowane tereny, czynnikami środowiskowymi, które mogą wywołać u płazów stres środowiskowy, są mieszaniny złożonych czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych. Wiele z nich jest pochodzenia antropogenicznego. W celu przystosowania się do tych niekorzystnych czynników środowiskowych zwierzęta zmuszone były osiąść homeostatyczną zdolność do redukcji złożonych skutków wielorakich zanieczyszczeń.

PODSUMOWANIE

Ołów jest metalem bardzo toksycznym dla organizmów żywych. Do organizmów zwierzęcych i ludzkiego może się on przedostawać przez powłoki skórne oraz układ oddechowy i pokarmowy. Występuje w organizmie w dwóch pulach: szybko-wymiennej (krew, tkanki miękkie) i wolno-wymiennej (kości). W naczyniach krwionośnych występuje głównie w erytrocytach (ok. 75 %), oraz w połączeniu z albuminą, która transportuje jony ołowiu do poszczególnych tkanek: mózgu, nerek, wątroby, mięśni szkieletowych i serca. Toksyczny wpływ ołowiu jest wielokierunkowy: zmienia aktywność wielu enzymów poprzez wiązanie się z grupami sulfhydrylowymi (-SH), aminowymi i karboksylowymi, do których wykazuje bardzo duże powinowactwo, zmienia właściwości białek w komórce, prowadząc do destabilizacji procesów metabolicznych (metabolizm energetyczny i anaboliczny), ma wpływ na tworzenie wolnych rodników tlenowych, powstanie zjawiska stresu oksydacyjnego, co w efekcie prowadzi do uszkodzeń wewnątrzkomórkowych i jest przyczyną powstawania licznych dysfunkcji.

⁵⁸ N. E. Fink, A. Selibàn, op. cit.

⁵⁹ M. Mulvey, S. A. Diamond, *Genetic factors and tolerance acquisition in population exposed to metals and metalloids*, [w:] *Metal Ecotoxicology. Concepts and Applications*, eds. M. C. Newman, A. W. McIntosh, Chelsea (Michigan) 1991, s. 301–321.

RESPONSE OF AMPHIBIANS TO THE PRESENCE OF LEAD IONS IN WATER

A contamination of the natural environment is the main problem of the contemporary world. Heavy metal ions are environmentally persistent toxins. A lead-related pathologies (including neurological, hematological, reproductive, circulatory, and immunological pathologies) are the direct result of the oxidative effect of the lead on tissues and cellular components and the generation of reactive oxygen species that decrease level of the available sulfhydryl groups, the antioxidant reserves, can cause nucleic acids damage and initiate lipid peroxidation in cellular membrane. Through binding to thiol groups of allosteric proteins, lead ions can provoke allosteric transition between active and inactive forms. The exposure to heavy metal ions is a direct factor in high mortality rate among amphibians. These animals can become indicators of environmental pollution. The main aim of this paper is to review and summarize the results of performed studies concerning physiological, biochemical and immunological changes in anuran amphibians exposed to the effects of lead ions.

WYKAZ SKRÓTÓW

ALA	kwasy δ-aminolewulinowy
ALAD	dehydratazy kwasu δ-aminolewulinowego
LD50	dawka letalna 50%
PMN	komórki z segmentowanym jądrem
RBC	krwinki czerwone
WBC	krwinki białe
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa

BIBLIOGRAFIA

1. Arieta M. A., Peri S. I., Apartín C., Rosenberg C. E., Fink N. E., Salibián A., *Blood lead concentration and δ-aminolevulinic acid dehydratase activity in adult Bufo arenarum*, „Archives of Physiology and Biochemistry” 2000, nr 108.
2. Arieta M. A., Bruzzone L., Apartín C., Rosenberg C. E., Fink N. E., Salibián A., *Biosensors of inorganic lead exposure and effect in an adult amphibian*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2004, nr 46.
3. Balding P., Gold E. R., *The natural heterohemoagglutinin in the serum of the toad Bufo regularis and its relationship to lower vertebrate immunoglobulins*, „Immunology” 1976, nr 30.
4. Barabowska-Bosiacka I., Chlubek D., *Biochemiczne mechanizmy neurotoksycznego działania ołowiu*, „Postępy Biochemii” 2006, nr 52.
5. Bertini F., Cei J. M., *Observaciones electroforéticas en seroproteínas de poblaciones argentinas de Bufo arenarum Hensel*, „Review of Society Argent Biology” 1960, nr 36.
6. Berzins D. W., Bundy K. J., *Bioaccumulation of lead in Xenopus laevis tadpoles from water and sediment*, „Environment International” 2002, nr 28.
7. Birdsall C. W., Grue C. E., Anderson A., *Lead contamination in bullfrog Rana catesbeiana and green frog R. clamitans tadpoles inhabiting highway drainages*, „Environmental Pollution” 1986, nr 40A.

8. Boguszewska A., Pasternak K., *Olów – wpływ na procesy biochemiczne w organizmie ludzkim*, „Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia” 2004, nr 59.
9. Boutillier R. G., Stiffler D. F., Toews D. P., *Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians*, „Environmental Physiology of the Amphibians” 1992.
10. Burggren W. W., Just J. J., *Developmental changes in physiological systems*, „Environmental Physiology of the Amphibians” 1992.
11. Caspers M. L., Siegl G. J., *Inhibition by lead of human erythrocyte (Na⁺/K⁺) Adenosine triphosphatase associated with binding of 210Pb to membrane fragments*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1980, nr 600.
12. Chiesa M. E., Rosenberg C. E., Fink N. E., Salibián A., *Serum protein profile and blood cell counts in adult toads Bufo arenarum (Amphibia: Anura: Bufonidae): Effects of sublethal lead acetate*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2006, nr 50.
13. Daniell W. E., Stockbridge H. L., Labbe R. F., Woods J. S., Anderson K. E., Bissell D. M., Bloomer J. R., Ellefson R. D., Moore M. R., Pierach C. A., Schreiber W. E., Tefferi A., Franklin G. M., *Environmental chemical exposures and disturbances of heme synthesis*, „Environmental Health Perspectives” 1997, nr 105.
14. Davic R. D., Gallati W. W., *Erythrocyte number in three species of northern Appalachian Desmognathus (Amphibia, Urodela, Plethodonitidae)*, „Journal of Herpetology” 1979, nr 13.
15. Du Pasquier L., *The immune system of invertebrates and vertebrates*, „Comparative Biochemistry and Physiology” 2001, nr 129.
16. El-Sokkary G. H., Abdel-Rahman G. H., Kamel E. S., *Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats*, „Toxicology” 2005, nr 213.
17. Fink N. E., Selibán A., *Toxicological studies in adult amphibians: Effects of lead*, „Applied Herpetology” 2005, nr 2.
18. Fink de Cabutti E. N., Morales V. H., Jmelnitzky C., Basualdo Farjat J. A., de Torres R., *Aspectos inmunológicos en portadores crónicos asintomáticos del HbdAg*, „Sangre” 1984, nr 29.
19. Fragou D., Fragou A., Kouidou S., Njau S., Kovatsi L., *Epigenetic mechanism in metal toxicity*, „Toxicology Mechanism and Methods” 2011, nr 21.
20. Gilbertson M. K., Hafner G. D., Drouillard K. G., Albert A., Dixon B., *Immunosuppression in the Northern leopard frog (Rana pipiens) induced by pesticide exposure*, „Environmental Toxicology & Chemistry” 2003, nr 22.
21. Governa M., Valentino M., Visona I., *In vitro impairment of human granulocyte functions by lead*, „Archives of Toxicology” 1987, nr 6.
22. Gurer H., Ercal N., *Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?*, „Free Radical Biology & Medicine” 2000, nr 29.
23. Hadji-Azimi I., Coosemans V., Canicatti C., *Atlas of adult Xenopus laevis laevis hematology*, „Developmental & Comparative Immunology” 1987, nr 11.
24. Haywood L. K., Alexander G. J., Byrne M. J., Cukrowska E., *Xenopus laevis embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium*, „African Zoology” 2004, nr 39.
25. Houlahan J. E., Findlay C. S., Schmidt B. R., Meyer A. H., Kuzmin S. L., *Quantitative evidence for global amphibian population declines*, „Nature” 2000, nr 404.
26. Ireland M. P., *Lead retention in toads Xenopus laevis fed increasing levels of lead-contaminated earthworms*, „Environmental Pollution” 1977, nr 12.
27. Jeremin B., Bogdanowicz B. *Wpływ ołowiu na stan i funkcję układu odpornościowego*, „Wiadomości Lekarskie” 1991, nr 44 (3/4).

28. Jurd R. D., *A natural heterohaemagglutinin in Xenopus laevis serum*, „Immunology” 1987, nr 34.
29. Kowalak A., *Metale śmierci*, Centrum Edukacji Ekologicznej Wsi, Krosno 1991
30. Linder G., Grillitsch B., *Ecotoxicology of metals*, [w:] *Environmental of amphibian and reptiles*, eds. D. W. Sparling, G. Linder, C. A. Bishop, Pensacola 2000, s. 325–459.
31. Lombourdis N. S., Wray D., *Heavy-metal concentration in the frog Rana ridibunda from a small river of Macedonia, Northern Greece*, „Environmental International” 1998, nr 24.
32. Mann R., Bidwell J., *Toxicological issues for amphibians in Australia*, [w:] *Declines and Disappearances of Australian Frogs*, ed. A. Campbell, Canberra 1999, s. 185–201.
33. Martynowicz H., Andrzejak R., Mędraś M., *Wpływ ołowiu na funkcje gonad męskich*, „Medycyna Pracy” 2005, nr 56.
34. McCabe M. J., *Lead*, [w:] *Immunotoxicology of Environment and Occupational Metals*, eds. J. T. Zelikoff, P. T. Thomas, London 1998, s. 111–129.
35. McCabe M. J., Lawrence D. A., *The heavy metal lead exhibits B cell-stimulatory factor by enhancing B cell Ia expression and differentiation*, „Journal of Immunology” 1990, nr 145.
36. Mulvey M., Diamond S. A., *Genetic factor and tolerance acquisition in population exposed to metals and metalloids*, [w:] *Metal Ecotoxicology. Concepts and Applications*, eds. M. C. Newman, A. W. McIntosh, Chelsea (Michigan) 1991, s. 301–321.
37. Newman M. C., Unger M. A., *Fundamentals of Ecotoxicology*, Boca Raton 2003.
38. Patric L., *Lead toxicity, a review of the literature. Part I: exposure, evaluation and treatment*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11.
39. Patric L., *Lead Toxicity Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in pathology and treatment of lead toxicity*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11.
40. Peri S. I., Fink N. E., Salibián A., *Hematological parameters in Bufo arenarum injected with sublethal dose of Pb acetate*, „Biomedical and Environmental Sciences” 1998, nr 11.
41. Quig D., *Cysteine Metabolism and Metal Toxicity*, „Alternative Medicine Review” 1998, nr 3.
42. Raghavan S. R. V., Culver B. C., Gonik C., *Erythrocyte lead-binding protein after occupational exposure*, „Environmental Research” 1980, nr 22.
43. Rollins-Smith L. A., Hopkins B. D., Reinert L. K., *An amphibian model to test effect of xenobiotic chemicals on development of the hematopoietic system*, „Environmental Toxicology & Chemistry” 2004, nr 23.
44. Rosenberg C. E., Per S. I., Arrieta M. A., Fink N. E., Salibián A., *Red blood cell osmotic fragility in Bufo arenarum exposed to Pb*, „Archives of Physiology and Biochemistry” 1998, nr 106.
45. Rosenberg C. E., Fink N. E., Arrieta M. A., Salibián A., *Effect of lead acetate on the in vitro engulfment and killing capability of the toad (Bufo arenarum) neutrophils*, „Comparative Biochemistry and Physiology” 2003, nr 136C.
46. Rowe C. L., Hopkins W. A., Coffman V. R., *Failed recruitment of Southern toads (Bufo terrestris) in trace element-contaminated breeding habitat: direct and indirect effect that may lead to a local population sink*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2003, nr 40.
47. Schluter S. F., Bernstein R. M., Marchalonis J. J., *Molecular origins ad evolution of immunoglobulin heavy-chain genes of jawed vertebrates*, „Immunology Today” 1997, nr 18.
48. Sharma S. S., Dietz K. J., *The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance*, „Trends in Plant Science” 2009, nr 14.
49. Skoczyńska A., Poręba R., Sieradzki A., Andrzejak R., Sieradzka U., *Wpływ ołowiu i kadmu na funkcje układu immunologicznego*, „Medycyna Pracy” 2002, nr 53.

50. Sobotka J. M., Radwan R. G., *Teratogenesis induced by short – and long-term exposure of Xenopus laevis progeny to lead*, „Journal of Toxicology and Environmental Health” 1995, nr 44.
51. Steele C. W., Stickler-Shaw S., Taylor D. H., *Failure of Bufo americanus tadpoles to avoid lead-enriched water*, „Journal of Herpetology” 1991, nr 25.
52. Stohs, S. J., Bagchi, D., *Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions*, „Free Radical Biology & Medicine” 1995, nr 18.
53. Szubarkowska E., Gromysz-Kalkowska K., Wójcik K., *Behavior of the foredend blond elements in Rana esculenta after repeated contacts of the animals with a therapeutic dose of foschlor*, „Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology” 1990, nr 45.
54. Valko M., Morris H., Cronin M. T., *Metals, toxicity and oxidative stress*, „Current Medicinal Chemistry” 2005, nr 12.
55. Varela M. E., Sellarés M. E., *Sobre la morfología hemática de Bufo arenarum (Hensel)*, „Review of Society Argent Biology” 1937, nr 13.
56. Wahedi M. *Heavy metals-induced autoimmunity: a possible role for lead*, „Central European Journal of Immunology” 2000, nr 25.
57. Williams G. M., Iatropoulos M. J., *Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity*, „Toxicologic Pathology” 2002, nr 30.
58. Yeung G. L., *The influence of lead and environmental pollutants on metamorphosis of Rana urticularia (Amphibia: Ranidae)*, „Proc. Ark. Academic Society” 1978, nr 32.
59. Zapata A. G., Varas A., Torroba M., *Seasonal variations in the immunoe system of lower vertebrates*, „Immunology Today” 1992, nr 13.