

HISTOLOGICAL CHANGES IN *POECILIA RETICULATA* AFTER INTERACTION OF IONIZING RADIATION AND ZINC SULFID

Viera Almášiová, Andrej Renčko, Katarína Holovská, Michaela Špalková

ABSTRACT

In our experiment we have studied interaction of ionizing radiation and zinc at *Poecilia reticulata*. Fish were irradiated with a 20 Gy of gamma-rays. Zinc sulphate in concentration 25 mg.l⁻¹ was added to water in aquarium. Food intake, clinical symptoms and histological changes were followed after gamma-irradiation and zinc sulfid in guppy *Poecilia reticulata*. In the first days timidity and lethargy were observed. The most prominent clinical symptoms observed were emaciation, hampered breathing and haemorrhages. Histological findings corresponded with these symptoms.

Keywords: histological changes, ionizing radiation, zinc sulfid, *Poecilia reticulata*

ÚVOD

V súvislosti s rozsiahlym zavádzaním atómovej energie do praxe sa prejavila nutnosť vypracovať spôsoby ochrany pred žiarením. Z týchto dôvodov je dôležité poznať biologické vplyvy ionizujúceho žiarenia a patogenézu choroby z ožiarenia. V súčasnej dobe už bolo zhromaždené obrovské množstvo faktov o rôznych aspektoch pôsobenia ionizujúceho žiarenia na živé organizmy (Cigánková et al., 1993; Cigánková and Cigánek, 1998), avšak aj napriek tomu neexistuje jednotná teória mechanizmu ich biologického pôsobenia. Vo väčšine publikovaných prác sa venuje len malá pozornosť tak závažným účinkom interakcií žiarenia a kovov u rýb. Do ovzdušia, vody a pôdy sa dostávajú toxické látky, ktoré sa následne stávajú súčasťou kolobehu látok v prírode. Prírodnou súčasťou všetkých ekosystémov sú rôzne ťažké kovy (Koréneková et al., 2002; Nováková et al., 2007). Medzi najdôležitejšie kontaminanty životného prostredia zo skupiny ťažkých kovov patria ortuť, olovo, kadmium, zinok, meď, chróm a polokov arzén, ktoré nepriaznivo pôsobia na organizmus ľudí (Kimáková, 2008) aj zvierat (Kramárová et al., 2005; Kolesárová et al., 2008; Koréneková et al., 2008; Massányi et al., 2008; Lukačinová et al., 2008; Cigánková et al., 2010).

Klasickým príkladom prvku, ktorého biologický účinok je v maximálnej miere závislý na koncentrácii je zinok. Ako významný biogénny prvok je prítomný prakticky vo všetkých živočíšnych a rastlinných tkanivách. Ovplyvňuje syntézu a metabolizmus bielkovín, sacharidov a hormónov. Mechanizmus účinku a toxicita spočíva v inhibícii niektorých enzýmov acetylcholinesterázy, katalázy, kyslej fosfatázy, pepsínu, trypsínu a amylázy závislej na SH- skupinách (Bencko et al., 1984). Zinok ako karcinogén je preskúmaný najmenej, aj keď nádorové tkanivo má vyššiu koncentráciu zinku ako normálne. Boli potvrdené aj jeho mutagénne účinky. Pre overovanie citlivosti biotestov je štandardne používaný síran zinočnatý. Účinok gama žiarenia a zvýšených dávok zinku na ryby sa skúmal v relatívne menšom rozsahu. V ostatnej

dobe sa v biomedicínskych výskumoch začínajú používať alternatívne modelové systémy (Dvořák and Beňová 2002; Dvořák et al., 2005; Sklenář et al., 2006; Nováková et al., 2007). Široké uplatnenie nadobúdajú tiež akváriové ryby, predovšetkým *Poecilia reticulata* a *Danio rerio* (Lešník and Jurčina, 1994).

MATERIÁL A METODIKA

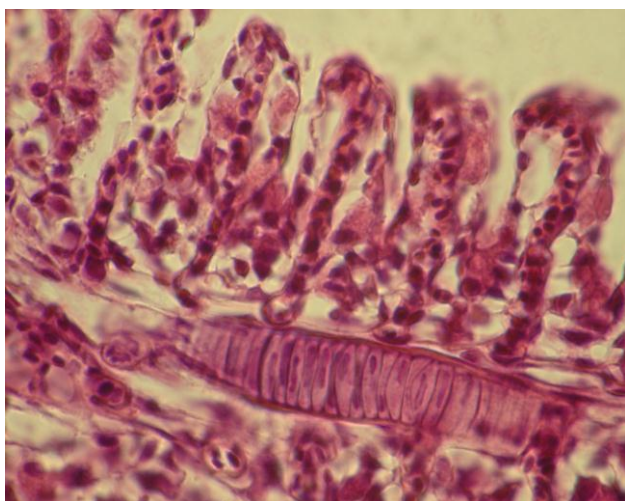
V experimente sme použili ryby *Poecilia reticulata* z laboratórneho chovu založeného pred dvoma rokmi z jedincov získaných zo špeciálneho chovu gupiek určených pre laboratórne účely. Chov sme udržiavali za konštantných podmienok: voda o teplote 24 °C, obsah Ca + Mg 0,7 mmol.l⁻¹, pH 7,04, umelé vzduchovanie, filtrácia vody, fotoperiódá 12 hod/deň (OECD, 1992). Ryby sme krmili živou, vložkovou a granulovanou potravou. Pokusné ryby náhodne vybrané a rozdelené do skupín sme chovali za rovnakých podmienok. V každej experimentálnej skupine bolo 30 rýb. Pre 1 chovnú skupinu sme použili akvárium o objeme 20 litrov. V priebehu pokusu sme skrmovali vložkové krmivo (AQUA EXOTIC, Kapušany, Slovakia).

V priebehu 30 dní po ožiarení sme ryby pozorovali a denne zaznamenávali údaje o klinických príznakoch a zmenách správania. Ryby boli ožiarené dávkou 20 Gy gama lúčmi ⁶⁰Co-zdroj Chisostat pri príkone 11,36 Gy/min. Ryby sme ožiarili v sklenenej Petriho miske v akváriovej vode, pri výške vodného stĺpca 1 cm. Zdanlivo boli ožiarené aj kontroly, t.j. podrobili sa všetkým procedúram manipulácie ako ožarované, s výnimkou samotného ožarovania gama lúčmi.

Do akváriovej vody sme pridali síran zinočnatý v koncentrácii 25 mg.l⁻¹. Vzorky na histologické vyšetrenie boli spracované bežne zaužívanou metódikou. Celé ryby boli fixované v 4 % neutrálnom formole a zaliate do parafínu. Histologické zmeny o hrúbke 7 µm boli ofarbené Hematoxylin-eozínom. Vzorky sme vyšetřovali svetelným mikroskopom JENAMED s digitálnym mikrografickým zariadením.

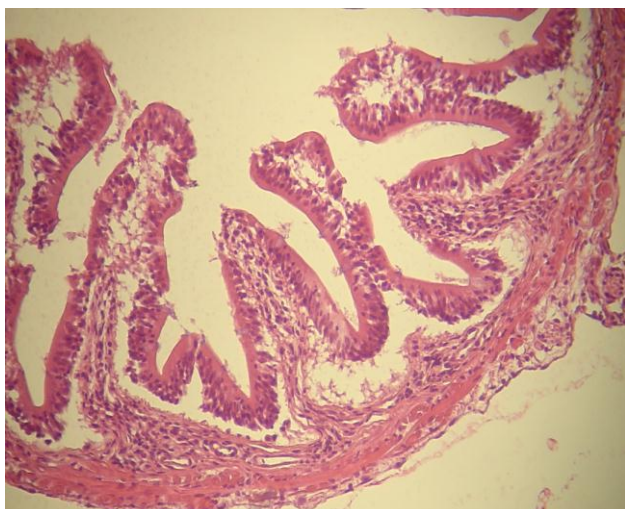
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prvých dňoch po ožiarení sme u rýb pozorovali plachosť a malátnosť, málo sa pohybovali a mali nekoordinované pohyby. Príjem potravy bol znížený a od 10. dňa po ožiarení sme pozorovali odmietanie potravy, čo viedlo k nápadnému vychudnutiu. Medzi prvé zmeny na tele ožiarených rýb patrilo exoftalmus na oboch očiach, ktorému často predchádzala hemoragia oka. Od 7. dňa po ožiarení sme pozorovali nápadné prudké dýchanie s kŕčovito doširoka otvorenými ústnymi otvormi. 3 dni pred úhynutím telo rýb bolo v polohe kolmo na hladinu tak, že papuľky mali na hladine a chvostové plutvy smerovali ku dnu akvária. Vyššie percento úhynu a výraznejšie klinické príznaky sme pozorovali u samíc. Naše pozorovania sa zhodujú s výsledkami aj iných autorov (Eliáš et al., 2004).

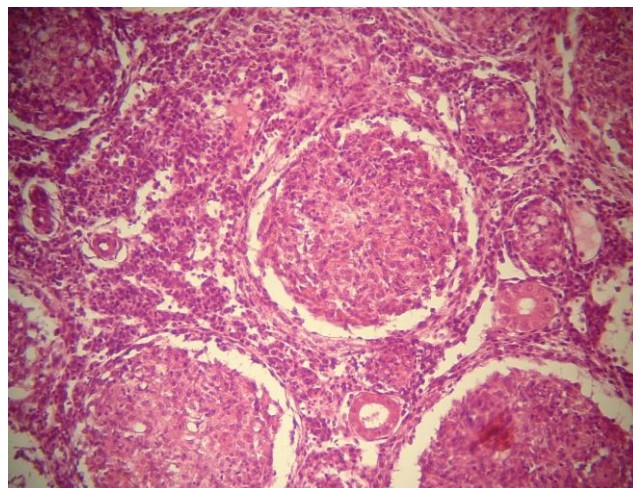


Obr. 1 Pozdĺžny rez časťou žiabier po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a síranu zinočnatého (H – E; zväčšenie 400 x)

Po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a zinku z klinických príznakov sme pozorovali plachosť, malátnosť, znížený príjem potravy, krvácaniny, sťažené



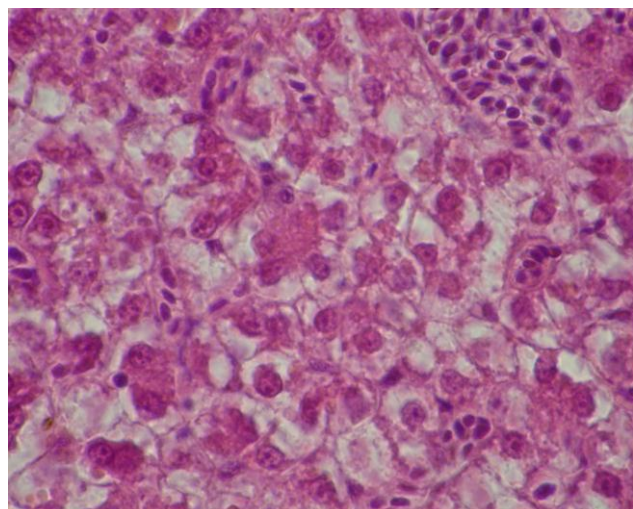
Obr. 2 Priečny rez časťou čreva po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a síranu zinočnatého (H – E; zväčšenie 200 x)



Obr. 3 Rez parenchýmom obličky po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a síranu zinočnatého (H – E; zväčšenie 200 x)

dýchanie a vychudnutosť.

Histologickým vyšetrením sme zistili u pokusných rýb po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a síranu zinočnatého na žiabrach patologické zmeny. Na báze epitelových buniek sa nachádzali vakuoly a v niektorých žiabrach sme pozorovali masy denzného materiálu. Predpokladáme, že sa jedná o krvné zrazeniny v cievach (obr. 1). Výrazné zmeny sme pozorovali aj v štruktúre čreva (obr. 2). Črevné klky boli výrazne poškodené v celom rozsahu. Epitel bol odlúpnutý a na báze črevných klkov sa nachádzali rozsiahle prázdne priestory. Pozorovali sme zvýšené množstvo intraepitelových lymfocytov, ako aj lymfocytov vo väzive. V dôsledku vysokej radiosenzitivity deliacich sa enterocytov dochádza k prerušeniu ich tvorby v kryptách, posunu k vrcholom klkov a náhrade funkčne odumretých enterocytov. Tento stav vedie k prerušeniu celého obnovovacieho procesu črevnej sliznice a strate funkčnej schopnosti črevnej sliznice. Klinicky sa tento stav prejavuje hnačkami, nechutenstvom a následnou kachexiou. Porušenie črevného



Obr. 4 Rez časťou parenchýmu pečene po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a síranu zinočnatého (H – E; zväčšenie 200 x)

bariéry bolo pozorované aj pri chorobe z ožiarenia u cicavcov (Procházka and Dvořák, 2002; Beňová et al., 2007) aj rýb (Beňová et al., 2009) a súvisí s vysokou rádiosenzitivitou epitelových buniek. Nami pozorované nechutenstvo je podobné ako sa uvádza po ožiarení cicavcov a vtákov a aké popisala u *Poecilia reticulata* ožiarených x-lúčmi (Seilerová, 1986).

V parenchýme obličiek boli najvýraznejšie poškodené obličkové telieska (obr. 3), ktoré boli ohraničené Bowmanovým púzdom s výrazne poškodeným jednovrstvovým dlaždicovým epitelom. Niektoré obličkové telieska obsahovali homogénny materiál a odumierali. Kanáliky nefrónu nejavili výraznejšie známky poškodenia štruktúry. V interstíciu tkaniva obličiek sa nachádzali zhluky hemopoetického tkaniva, ktoré zohráva dôležitú úlohu v tvorbe erytrocytov a leukocytov a množstvo krvných ciev.

V porovnaní s kontrolou sme morfológické zmeny pozorovali aj v parenchýme pečene po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a síranu zinočnatého (obr. 4). Pečeňové bunky – hepatocyty boli polyedrického tvaru s výrazným okrúhlym centrálnou uloženým jadrom a výrazným jadriekom a v ich cytoplazme sa nachádzali početné tukové vakuoly rôznej veľkosti. Krvné cievy boli nastrieknuté a obsahovali množstvo krvných elementov.

Zinok patrí k biogénnym prvkom a je prítomný prakticky vo všetkých živočíšnych a rastlinných tkanivách. Hlavnou cestou jeho vstupu do organizmu je inhalácia a ingescia. Resorpcia zinku v tráviacom aparáte je obmedzená. Do organizmu sa z čreva dostane len asi 10 %. Ak je sliznica tenkého čreva poškodená, vstrebávanie môže byť podstatne vyššie.

Po inhalácii pár alebo veľmi jemného prachu kovového zinku a oxidu zinočnatého dochádza u ľudí k tzv. horúčke zlievačov. Dostávajú sa pocity malátnosti, bolesti hlavy, sucho v ústach s pocitom kovovej chuti, škrabanie v krku, bolesti na hrudníku a dráždivý kašeľ. Po niekoľkých hodinách sa objaví zimnica a teplota vystúpi až na 39 °C. Horúčka trvá niekoľko dní a pripomína záchvat malárie. Klinicky možno na pľúcach nájsť astmoidný nález. Častá býva glykosúria, albuminúria a leukocytóza. Pri expozícii ZnCl₂ môže dôjsť k ťažkému postihnutiu dýchacieho aparátu, k pneumónii a pľúcnemu edému (Gandini et al., 2002). Otravy zlúčeninami zinku patria medzi zriedkavé ochorenia. Klinický obraz otravy rozpustnými soľami zinku nie je typický. Spočiatku dochádza len k zastaveniu rastu u mladých zvierat, alebo zlému zužitkovaniu krmiva. Vzniká lokálne bolestivé dráždenie až poleptanie sliznice hltana, žalúdka a čriev, čo má za následok zvracanie a krvavú hnačku s abdominálnymi bolesťami, vzniká pankreatitída (Smith and Embling, 1999; Hammond et al., 2004; Gandini et al., 2002; Meiser and Schulz, 1997). Nastáva pokles krvného tlaku a tachykardia. Poškodenie pečene sa prejavuje ikterickým zafarbením viditeľných slizníc (Hammond et al., 2004). Po dlhšom podávaní zvýšeného množstva zinku v krmive sa rast zvierat zastavuje, dostávajú sa únava, pri ošipaných krívanie, paréza panvových končatín a artritída. Pri akútnych otravách zinkom sa zvyšuje jeho obsah v pečeni a v mlieku, prejavuje sa malátnosť, znižuje sa chuť k prijímaniu potravy, objavujú sa hnačky, anémia.

ZÁVER

Po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a síranu zinočnatého sme pozorovali u rybičiek znížený príjem potravy, kachexiu, plachosť, malátnosť, sťažené dýchanie a početné hemorágie. Histologickým vyšetrením sme zistili výrazné morfológické zmeny na žiabrách, kde na báze epitelových buniek sa nachádzali vakuoly a v cievach krvné zrazeniny. Výrazné patologické zmeny boli aj v štruktúre čreva. Poškodené boli črevné klky, ich epitel bol odlúpnutý a výrazne bolo zvýšené množstvo intraepitelových lymfocytov, ako aj lymfocytov vo väzive. Nedochádzalo tu k obnove enterocytov v črevných kryptách a ich posunu k vrcholom klkov. V parenchýme obličiek boli najvýraznejšie poškodené obličkové telieska, zatiaľ čo kanáliky nefrónu nejavili výraznejšie známky poškodenia. V cytoplazme pečene buniek sa nachádzali početné tukové vakuoly rôznej veľkosti a krvné cievy boli výrazne nastrieknuté. Na základe uvedených klinických príznakov a patologicko-morfológických zmien v sledovaných orgánoch u rýb po kombinovanom účinku ionizujúceho žiarenia a zinku konštatujeme, že tieto sú podobné ako boli popísané u vtákov, cicavcov aj u ľudí.

LITERATÚRA

- BENCKO, V., CIKRT, M., LENER, J. 1984. Toxické kovy v pracovnom a životnom prostredí človeka. Praha, Avicenum, s. 48-56.
- BEŇOVÁ, K., STRÍŠKOVÁ, K., DVOŘÁK, P. 2007. Postirradiational changes in hematologic parameters and in intestinal microflora in rats. *Acta Facult. Ecol.*, vol. 16, Suppl. no. 1, p. 33-36.
- BEŇOVÁ, K., DVOŘÁK, P., HALÁN, M., KALENIČOVÁ, Z., SEHNÁLKOVÁ, H., CIGÁNKOVÁ, V. 2009. Effects of gamma-irradiation on microbial contamination and on histological changes of muscle in *Poecilia reticulata*. *Acta Vet. Brno*, no. 78, p. 173-177.
- CIGÁNKOVÁ, V., CIGÁNEK, J., TOMAJKOVÁ, E., 1993. Post-irradiation morphological changes in the testes of adult dogs. *Folia Veter.* vol. 37, no. 3-4, p. 103-109.
- CIGÁNKOVÁ, V., CIGÁNEK, J., TOMAJKOVÁ, E. 1996. Post-irradiation morphological changes in the testes of sexually immature dogs. *Folia Veter.* vol. 40, no. 1-2, p. 5-8.
- CIGÁNKOVÁ, V., CIGÁNEK, J. 1998. Apoptóza a nekróza semenníkov psov po ožiarení gama lúčmi. *Slov. Vet. Čas.* no. 23, p. 259-263.
- CIGÁNKOVÁ, V., ALMÁŠIOVÁ, V., HOLOVSKÁ, K. 2010. Morphological changes in duodenal epithelium of Japanese quail after chronic cadmium exposure. *Polish J. of Environ. Stud.* vol. 19, no. 2, p. 275-282.
- DVOŘÁK, P., BEŇOVÁ, K. 2002. The investigation of interaction of low doses of ionizing radiation and risk factors by means of *Artemia salina* biotest. *Folia Veter.*, vol. 46, no. 4, p. 195-197.
- DVOŘÁK, P., ŠUCMAN, E., BEŇOVÁ, K. 2005. The development of a ten-day biotest using *Artemia salina* nauplii. *Biologia Bratislava* vol. 60, no. 5, p. 593-597.
- ELIÁŠ, E., BEŇOVÁ, K., FALIS, M., KEREKÉNIOVÁ, E. 2004. Changes of ionizing radiation on *Poecilia reticulata* exposed to various doses. VI. KMVP, VFU Brno, p. 142-144, ISBN 7305-493-0,
- GANDINI, G., BETTINI, G., PIETRA, M., MANDRIOLI, L., CARPENE, E. 2002. Clinical and pathological findings of acute zinc intoxication in a puppy. *J. Small Anim. Pract.* no. 43, p. 539-542.

- HAMMOND, G. M., LOEWEN, M. E., BLAKLEY, B. R. 2004. Diagnosis and treatment of zinc poisoning in a dog. *Veterinary and Human Toxicology* no. 46, p. 272-275.
- KIMÁKOVÁ, T. 2008. Niektoré informácie k výskytu ortuti na Slovensku. *Medicínsky monitor* no. 4, s. 8-15.
- KOLESÁROVÁ, A., SLAMEČKA, J., JURČÍK, R., TARTARUCH, F., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., CAPCAROVÁ, M., VALENT, M., MASSÁNYI, P. 2008. Environmental levels of cadmium, lead and mercury in brown hares and their relation to blood metabolic parameters. *J. Environm. Sci. Health A* no. 43, p. 646-650.
- KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M., NAĎ, P. 2002: Cadmium exposure of cattle after long-term emission from polluted area. *Trace Elem. Electrolytes* no. 19: p. 97-99.
- KORÉNEKOVÁ, B., SKALICKÁ, M., KOŽÁROVÁ, I., NAGY, J., MÁTĚ, D., NAĎ, P. 2008. Comparison of cadmium, lead and nickel accumulation in liver, breast and leg muscles of shot and killed pheasants. *Slov. J. Anim. Sci.* vol. 41, no. 4, p. 184-186.
- KRAMÁROVÁ, M., MASSÁNYI, P., SLAMEČKA, J., TATARUCH, F., JANČOVÁ, A., GAŠPARÍK, J., FABIŠ, M., KOVÁČIK, J., TOMAN, R., GALOVÁ, J., JURČÍK, J. 2005. Distribution of cadmium and lead in liver of some wild animals in Slovakia. *J. Environ. Sci. Health A*, no. 40, p. 593-600.
- LEŠNÍK, F., JURČINA, A. 1994. Model system-fishis. *Veterinářství* 2, no. 94, p. 77.
- MASSÁNYI, P., WEIS, J., LUKÁČ, N., TRANDŽÍK, J., BYSTRICKÁ, J. 2008. Cadmium, zinc, copper, sodium and potassium concentrations in rooster and turkey semen and their correlation. *J. Environm. Sci. Health A* no. 43, p. 563-565.
- LUKACINOVA, A., BENACKA, R., LOVASOVA, E., RACZ, O., NISTIAR, F. 2008. Reproduction parameters in low dose chronic exposure with heavy metals in rats. *Polish J. Environ. Stud.* no. 17, p. 911.
- MEISER, H., SCHULZ, R. 1997. Zinc poisoning and copper deficiency in the dog – an expanded case study. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* no. 110, p. 284-287.
- NOVÁKOVÁ, J., DAŇOVÁ, D., STRIŠKOVÁ, K., HROMADA, R., MIČKOVÁ, H. 2007. Zinc and cadmium toxicity using a biotest with *Artemia franciscana*. *Acta Vet. Brno* no. 76, p. 635-642.
- SEIDELOVÁ, A. 1986. Lethal effect of X-rays on penquin fish varieties *Poecilia reticulata* Peters and *Brachydanio rerio*. *Radiobiologia* no. 6, p. 820-822
- SKLENÁŘ, Z., DVORÁK, P., BEŇOVÁ, K. 2006. Možnosti využití biotestu s salina pri studování *Artemia* toxikologických účinků inhibitoru cyklin-dependentních kináz. *Klin. Farmakol. Farm.* no. 20, p. 62-65.
- SMITH, B. L., EMBLING, P. P. 1999. Effect of prior sporidesmin intoxication on the pancreopathy associated with zinc oxide toxicity, *New Zeland Veterinary Journal* no. 47, p. 25-27.

Contact address:

MVDr. Viera Almasiova, PhD., University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice, Komenskeho 73, 041 81 Kosice, Slovak Republic, E-mail: almasiova@uvm.sk

MVDr. Andrej Rencko, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice, Komenskeho 73, 041 81 Kosice, Slovak Republic, E-mail: rencko@uvm.sk

MVDr. Katarina Holovska, PhD., University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice, Komenskeho 73, 041 81 Kosice, Slovak Republic, E-mail: kholovska@uvm.sk

MVDr. Michaela Spalkova, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice, Komenskeho 73, 041 81 Kosice, Slovak Republic, E-mail: spalkova@uvm.sk