

Jorunn Bjørnsen
Marit Hansen
Liv Mette Harboe
Asbjørn Jokstad
Svein Roseth

Biologisk institutt.
Universitetet i Oslo.

*Toksisitet og subcellulær binding
av kadmium hos sebrafisk.*

Prosjektoppgave 6.1, BIO 241.

Vår 1989.

Jorunn Bjørnsen
Marit Hansen
Liv Mette Harboe
Asbjørn Jokstad
Svein Roseth

Prosjektoppgave 6.1
BIO 241 VÅR 1989

TOKSISITET OG SUBCELLULÆR BINDING AV KADMIUM HOS SEBRAFISK

I. INTRODUKSJON

Kadmium er et sjeldent element og finnes naturlig i svært små mengder i jordskorpen tilsvarende ca. 0.15-0.20 ppm. De spesielle metallurgiske egenskapene til kadmium er slik at det blir benyttet i stadig økende grad i ulike industrielle prosesser. Det ble i 1981 produsert og forbrukt ca. 17 000 tonn kadmium på verdensbasis. Kadmium blir hovedsakelig anvendt i industrien som bestanddel i pigmenter og som stabilisatorer i keramikk- og plastikk-industrien. Andre anvendelsesområder er i batterier og som flykomponenter. De industrielle aktivitetene samt forbruk av olje har bidratt til økende utslipp av kadmium til omgivelsene. Mesteparten av det kadmiumet som blir frigjort til naturen blir deponert på land eller i overflatevann og kan senere bli akkumulert i terrestriske eller akvatiske organismer. Sensitivitet overfor kadmium hos fisk er svært varierende. Laksefisk har f.eks lav LC-50 verdi, mens abbor har relativ høy LC-50 verdi. Man tror at kadmium som kommer inn i en organisme binder seg til -SH grupper på proteinene, og kan dermed hemme intracellulære prosesser. Metallothionein er et cysteinrikt protein, og binder seg derfor godt til Cd^{2+} . Produksjon av metallothionein induseres når det er kadmium tilstede, men proteinet kan også induseres av andre ioner, som Zn^{++} . Metallothionein har høy affinitet for kadmium. Kadmium som har vært bundet til ulike proteiner vil etterhvert bli fanget opp av metallothionein, og danne relativt stabile komplekser. Når metallothionein er indusert senkes toksisitet

av kadmium. Formålet med denne prosjektoppgaven var å belyse sammenhengen mellom toksisitet av kadmium og subcellulær binding i en liten tropisk ferskvannsfisk, sebrafisk (Brachydanio rerio).

II. MATERIALER OG METODER

Organisme: Sebrafisk (ca. 2-5 cm), produsert ved biologisk institutt, UiO. 60 stk.

Kjemikalier: Sink sulfat $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Kadmiumklorid $CdCl_2 \cdot H_2O$

Sephadex G-75-gel, Protein assay (Bio Rod)

Tris-buffer

Eksperimentell apparatur: Det ble i forsøket benyttet syrevaskede og senere destillasjon rensede glasskar som ble fylt opp med 18 l rensert vann. Det ble tilkoblet luftpumpe og en termostyrt vannvarmer. Vanntemperaturen var hele tiden i området 23-28 °C. Under forsøket ble karene dekket av glasslokk for å forhindre fordampning.

Eksperimenter:

Forbehandling: Tillaging av 2 kar

Kar A: 18 liter rent H_2O samt 30 fisk

Kar B: 18 liter rent H_2O tilsatt 2.0 mg/l Zn samt 30 fisk

Det var meningen at fisken skulle gå i disse løsningene i 1 uke, men etter 3 dager var så mange i sinkløsningen døde at de ble flyttet over i rent vann.

Kadmiumbehandling

Dag 1: Tillaging av 9 kar

Fisken ble etter 55 timer fordelt og flyttet over i 9 kar

Kar 1-2-3-4-5: Fisk fra kar A.

Kar 6-7-8-9 : Fisk fra kar B.

Tabell 1. Mengde kadmium og antall fisk tilsatt i 9 kar. Konsentrasjonen av Cd før og etter behandling målt med Atomabsorpsjon-spektroskop(AAS).

Kar nr	Forbehandling	ng/l Kadmium	Antall fisk	AAS	
				Før	Etter
1	Vann	0.00	6	0	0
2	Vann	7.93	6		
3	Vann	3.90	6		
4	Vann	1.96	6	1.89	1.85
5	Vann	0.98	6	1.06	1.06
6	2 mg/l Zn	0.00	6	0	0
7	2 mg/l Zn	7.52	5		
8	2 mg/l Zn	3.76	5		
9	2 mg/l Zn	1.88	6	1.84	1.87

Dag 2-3-4 Karene ble kontrollert daglig kl. 09.00 og kl.16.00. Døde fisk ble fjernet omgående, veiet og nedfrost til - 80 °C. Dag 5: Fiskene ble gående i karene i tilsammen 96 timer, og deretter nedfrost til -80 °C.

Etter ca 4 uker ble alle fisker dissekert. Det har i tidligere eksperimenter vist seg at Cd hovedsakelig akkumuleres i gjelle, lever og nyre. Alle organene i bukhulen samt gjellene ble dissekert ut. Prøver for alle fisk fra hvert kar ble slått sammen.

Prosedyre:

1. Organer fra fisk fra et og samme kar (5 eller 6 fisk) ble samlet sammen og oppbevart på is.
2. Organene ble deretter skylt i elueringsbuffer, homogenisert på is (1g organ : 4 ml buffer), overført homogenat til eppendorf-rør, og sentrifugert.
3. Proteiner i supernatanten ble separert ved hjelp av gelfiltrering på Sephadex G-75. Fraksjonene ble samlet opp i små plastrør og nedfrosset.
4. Kadmium i de oppsamlede fraksjoner (Ca. 1,5 ml) ble målt ved hjelp av AAS. Absorpsjon ble målt ved 254 nm.

Kadmium-konsentrasjonen i fraksjonene ble beregnet og normalisert med hensyn til protein-konsentrasjonene i hver av ekstraktene.

III. RESULTAT

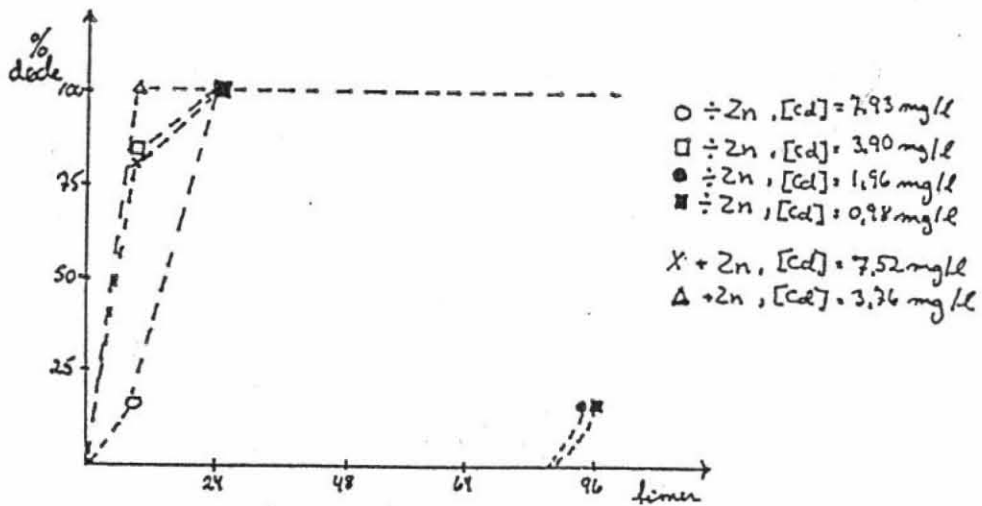
DEL 1 Undersøkelse av dødelighet

Tabell 2. Dødelighet ved behandling med Zn samt med forskjellige mengder tilsatt kadmium.

Kar nr	Zn	Cd mg/l	Ant. Fisk	Antall døde					%Døde fisk
				Dag1	Dag2	Dag3	Dag4	Dag5	
1	-	0	6	0	0	0	0	0	0
2	-	7.93	6	1	6	6	6	6	100
3	-	3.90	6	5	6	6	6	6	100
4	-	1.96	6	0	0	0	0	1	17
5	-	0.98	6	0	0	0	0	1	17
6	+	0	6	0	0	0	0	0	0
7	-	7.52	5	4	5	5	5	5	100
8	+	3.76	5	5	5	5	5	5	100
9	+	1.88	6	0	0	0	0	0	0

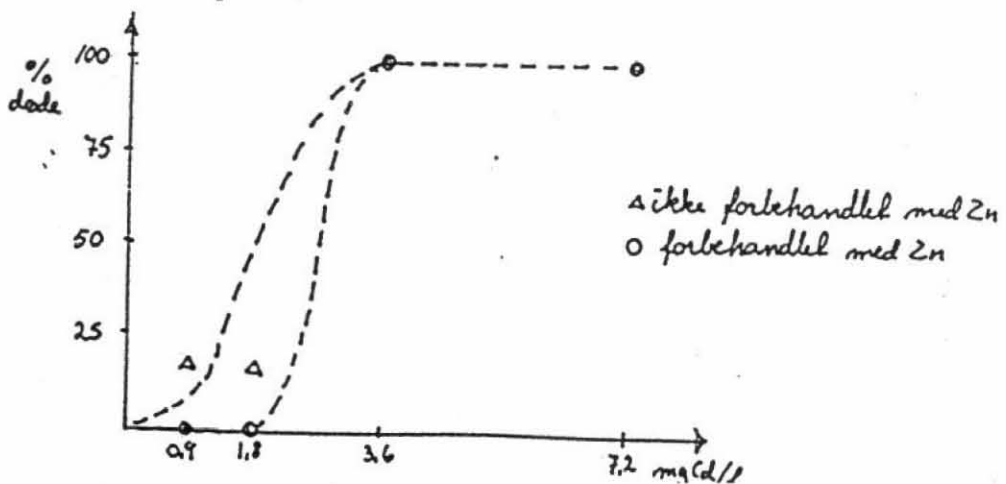
Grafisk fremstilling av resultatene er presentert i Fig 1.1

Fig 1.1 Død over tid for de forskjellige behandlinger



I kar med høyt kadmiumnivå (> 3.8 mg Cd/l) døde alle i løpet av 24 timer, uansett forbehandling. Blant fisk som ikke var forbehandlet døde 17%, dvs 1 fisk, men først etter 4 døgn.

Fig 1.2 Dose respons, LC50

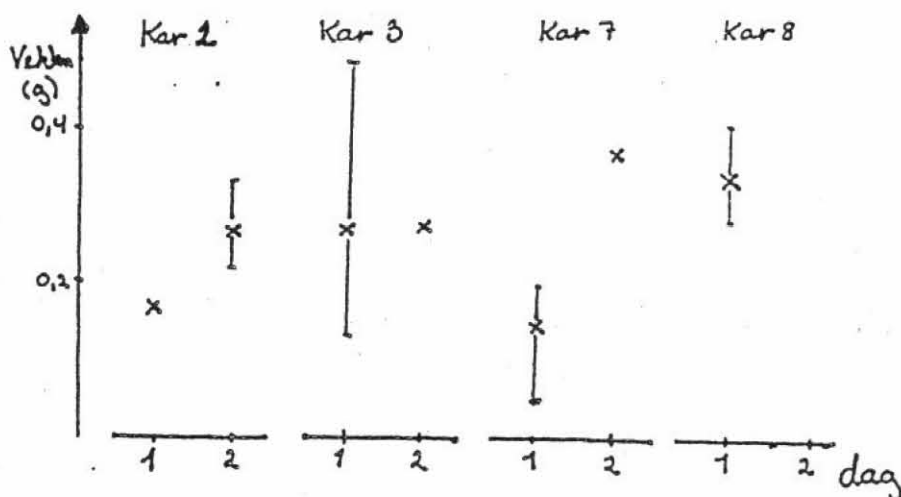


Pga det reduserte observasjonsantall er det vanskelig å trekke kurver. Det fremtrer imidlertid et inntrykk av forskjellen på forbehandlet og ikke forbehandlet fisk. De beregnede LC50 verdiene er:

Ubehandlet: LC50 = 1,8 mg/l

Behandlet : LC50 = 2,7 mg/l

Fig 1.3. Sammenheng mellom tidspunkt for fiskedød og vekt. Gjennomsnitt, samt minimum og maksimum vekt av de døde fiskene 1. og 2. dag. Antall fisk varierte fra 1 til 5 fisk.



Det kan se ut til at de fiskene som dør tidligst er litt større enn de som dør senere, men for andre behandlinger er det ingen forskjell i størrelse.

DEL 2 Undersøkelse av subcellulær kadmium-binding

Tabell 3. Proteinmengden i ekstraktet som ble brukt i gelfiltreringen.

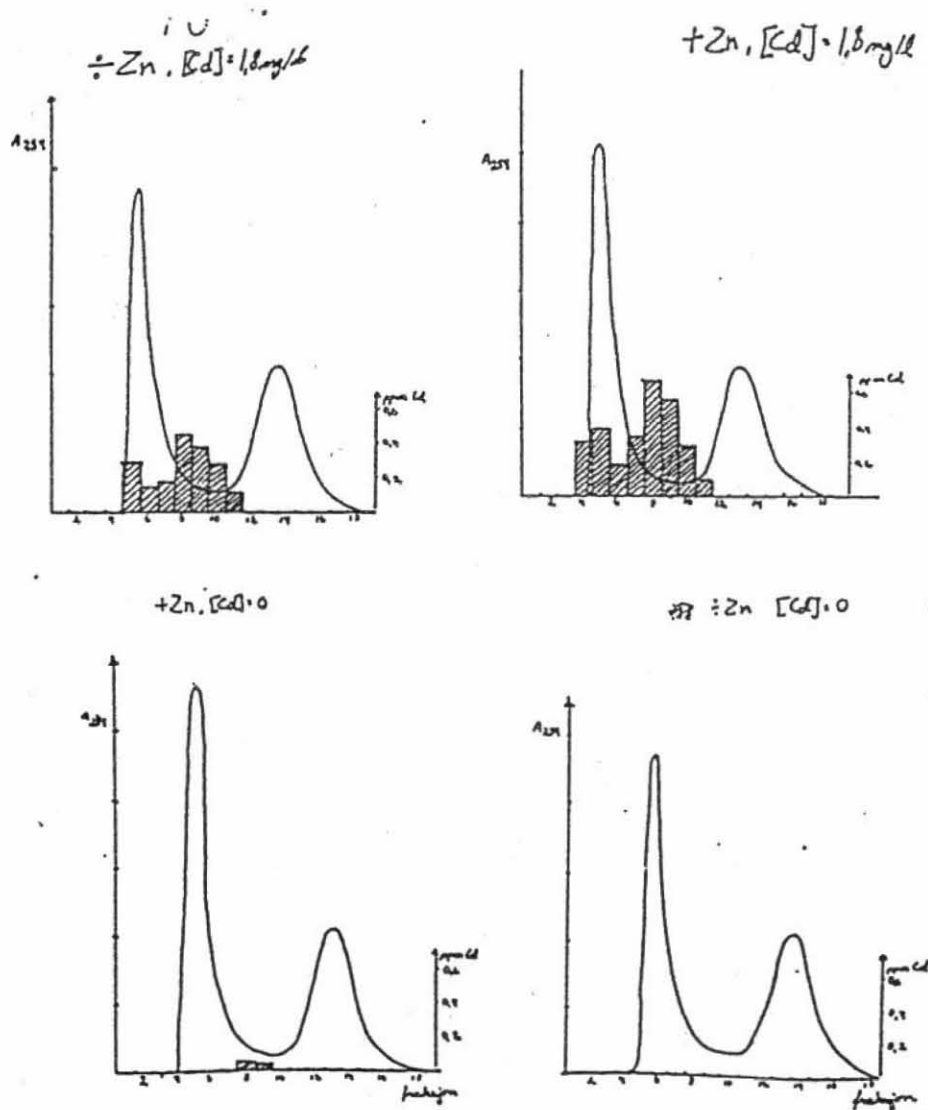
Kar	Behandling		Protein
	Zn	Cd	mg/l
Kar 1	-	-	1,6
Kar 4	-	+	4,0
Kar 6	-	-	5,4
Kar 9	+	+	2,4

Tabell 4 Måling av kadmiumkonsentrasjon i de forskjellige fragmentene fra gelfiltreringen.

Fraksjon nr	-Zn Cd ppm	-Cd Cd/protein	-Zn Cd ppm	+Cd Cd/protein	+Zn Cd ppm	-Cd Cd/protein	+Zn Cd ppm	+Cd Cd/protein
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0.080	0.033
5	0	0	0.11	0.028	0	0	0.095	0.040
6	0	0	0.06	0.015	0	0	0.045	0.019
7	0	0	0.075	0.019	0	0	0.085	0.035
8	0	0	0.180	0.045	0.035	0.006	0.160	0.067
9	0	0	0.150	0.038	0.030	0.005	0.135	0.056
10	0	0	0.110	0.028	0	0	0.070	0.029
11	0	0	0.045	0.011	0	0	0.025	0.010
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0

Alle målinger under 0.025 ppm ble notert som 0, da dette er for små mengder til å gi sikre resultat

Fig 2.1 Absorpsjon fra elueringsdiagrammet og Cd konsentrasjon i de forskjellige fragmentene



De første toppen er molekyler med MW > 100000 og den minste er molekyler med MW < 5000. Man ser at hovedtyngden av kadmium er bundet til et molekyl med MW mellom dette. Det kan tyde på at kadmium bindes til et metallothionein-lignende protein, da dette proteinet tilsynelatende har en molekylvekt på 10 000. Når fisken har vært forbehandlet med Zn er dette proteinet blitt indusert, og den binder da til seg mye mer kadmium som ellers ville vært mer fordelt.

Fisk som ikke har vært utsatt for kadmium i forsøket, men har fått indusert proteinet, har en oppsamling av kadmium bundet til et metallothioneinlignende protein. Det kan være fordi det er litt Cd fordelt på andre proteiner i fisken fra tidligere. Disse mengdene er for lave til å slå ut på målinger, men når proteinet er indusert, samler dette opp all Cd, og en målbar konsentrasjon oppstår. Det er også en del kadmium bundet til større molekyler. Årsaken kan være at det metallothioneinlignende proteinet ikke har rukket å "fange opp" all kadmiumet, og at det derfor er bundet til større proteiner. Men det kan også skyldes at metallothioneinproteinene har aggregert til større molekyler.

IV. DISKUSJON

Ut i fra de observerte LC50 verdier, og resultatene fra subcellulær kadmium-binding kan det se ut som det har skjedd en induksjon av metallothionein med molekylvekt = 10 000, som følge av forbehandling med sink. Det er mulig sink kan aktivere et gen som koder for proteinet. Dannelsen av det metallothionein-lignende proteinet fører sannsynligvis til økt beskyttelse mot den toksiske effekten av kadmium. Dette kan skje ved at kadmium bindes til proteinet slik at vi får et kadmium-metallothionein kompleks, og på denne måten inaktiveres den toksiske aktivitet til kadmium. Resultatene viser også at ett annet makroprotein med lavere molekylvekt trolig også har bundet til seg små mengder kadmium. Proteinene kan være en oksydert utgave av metallothionein som har klumpet

seg sammen og dermed fått høyere molekylvekt. Oksyderingen kan skyldes at materialet (fiskene) under disseksjonen ikke raskt nok ble avkjølt. (Ufullstendig avgassing av bufferen som ble brukt). En annen faktor som kan ha påvirket resultatene kan være ulik vanntemperatur i karene, med påfølgende ulik metabolisering i fiskene. Videre kan det ha innvirket på resultatene at fiskene, til tross for at de var like gamle, befant seg på ulike utviklingstrinn.

V. KONKLUSJON

Både kadmium og sink induserte et metallothionein-lignende protein i sebrafisk. Forbehandling med sink hadde trolig en beskyttende effekt overfor senere eksponering av kadmium og dets toksiske effekt. Som følge av det begrensede observasjonsmateriale i dette laboratorieforsøket er det imidlertid usikkert å trekke konkrete slutninger fra resultatene.

VI. REFERANSER

Kay & Creyer. Environmental cadmium and metallothionein gene expression in freshwater fish. NERC News 1988;9:9-11.
Woodall, Maclean and Crossley. Responses of trout tar and tadpoles to cadmium and zinc. Comp Biochem Physiol 1988;89C:93-9.

Prosjektet ble utført ved Toksikologisk laboratorium,
Biologisk institutt, Blindern.

Takk til veiledere: Inger Oline, Kjetil og Jørgen