

## Summary

Cadmium (Cd) is an environmental and industrial pollutant of growing concern that adversely affects various organs in human and animals. This study was carried out to investigate the protective potentials of bovine milk proteins (casein, whey proteins) on Cd-induced toxicity throughout *in vitro* and *in vivo* studies.

The *in vitro* study was performed by testing different concentration of Cd on fibroblast cell culture after the addition of different concentrations of casein and whey peptides by the use of the Electric Cell substrate Impedance Sensing (ECIS) assay. While the *in vivo* study was conducted on 72 male and female albino Wistar rats strain randomly divided into six groups. (T1 - Cd group; +ve control) received CdCl<sub>2</sub> and control diet, (T2; -ve control) the group received filtered water and control diet, (T3 - Casein+CdCl<sub>2</sub>) the group received Cd and a casein based diet, (T4 - Casein) the group received filtered water and a casein based diet, (T5 - Whey Proteins+CdCl<sub>2</sub>) the group received Cd and a whey proteins based diet, (T6 - Whey Proteins) the group received filtered water and a whey based diet. The CdCl<sub>2</sub> was offered in drinking water at the concentration of 19.4 mM/L for 10 weeks. All of rats received a basal diet during the first five weeks of the experiment but during the 2nd five weeks they received different feeding treatments as follow: (T1,T2 -basal diet), (T3,T4 – casein based diet), ( T5,T6 – whey protein based diet ).

The *in vitro* ECIS experiment was conducted to study an intermediate-term exposure (20-25h) of different Cd concentration, in order to observe the fibroblast cell behavior in the presence or lack of casein and whey peptides in the medium. In the microscopic evaluation of time-dependent cytotoxicity, gradual morphological changes were observed and they were represented in early cell shrinkage, and round or oval-shaped appearances of fibroblast cells, which were the most obvious effects observed in the case of fibroblast treated with cadmium. In contrast, these types of morphological changes were not observed in fibroblast cultures treated with casein and whey protein peptides, which showed prophylactic activity against cadmium cytotoxicity. The whey protein peptides revealed better prophylactic activity against cadmium fibroblast cytotoxicity as compared with casein peptides.

In ECIS assay, with higher Cd concentration (6.2 μM), the value of the impedance decreased sharply with the time, which is an indication of cell death. While

earlier addition of casein and whey proteins peptides to the culture increased markedly the impedance value and protected from Cd toxicity. It could be stated that Cd could bind the milk peptides present in the medium avoiding its interaction with the fibroblast cell membrane.

In the *in vivo* study, administration of cadmium resulted in disturbance of serum calcium, cholesterol and triglycerides concentration, which increased significantly mainly in female rats receiving Cd and the control diet, while in rats exposed to Cd and fed on casein or whey protein based diet the cholesterol and triglycerides level were not affected. After the period of Cd exposure almost all of blood indices were not affected in both sexes of exposed rats. An exception were WBC and platelets counts in the blood of females rats, which were shown elevated values in both casein and whey proteins feeding groups.

Kidney and liver of rats of +ve control group showed significantly ( $P < 0.05$ ) higher Cd concentration as compared to other groups. In rats fed casein and whey protein+Cd in both sexes, a relatively decreased accumulation of cadmium in liver, and increased Cd elimination via hair and feces were observed. Cadmium exposition affected copper content in rat tissues, which is evidenced by a significantly increased concentration of this mineral in blood and liver of rats of both sex. Tissue accumulation of cadmium was associated with a decreased concentration of copper in the kidney, and decreased concentration of zinc in the liver. CdCl<sub>2</sub> at the dose of 19.4 mM/L in drinking water resulted in hepato-renal toxicity, which was indicated by the histopathological changes in liver and kidney. Cd treated rats showed hepatocyte necrosis, fatty changes, degeneration signs and inflammatory cell infiltrations. The kidney of Cd exposed rats showed glomerular and tubular changes shrinking and degeneration. Furthermore, Cd induced multiple foci of hemorrhage, congestions, edema, in the liver and kidneys. These alterations that are associated with Cd-toxicity were decreased by whey protein and casein feeding. The present study provided evidence that bovine milk proteins whey protein and casein have a protective effect against Cd toxicity. This could be due to enhanced antioxidant defense and metal chelating, therefore, whey proteins, casein could be useful nutritional-supplement to reduce the Cd toxicity.

**Keywords:** cadmium, casein, whey proteins, peptides, ECIS, fibroblast, liver, kidney, hair

## BADANIA NAD WPLYWEM KAZEINY I BIAŁEK SERWATKOWYCH MLEKA KROWIEGO NA TOKSYCZNOŚĆ KADMU U SZCZURÓW

### STRESZCZENIE

Skażenie środowiska kadmem (Cd) spowodowane jego uwolnieniem ze źródeł naturalnych i przemysłowych jest narastającym problemem zdrowotnym ze względu na negatywne działanie na strukturę i funkcję wielu narządów ludzi i zwierząt.

Niniejsze badania przeprowadzono w celu określenia potencjalnego działania ochronnego białek mleka krowiego (kazeinia i białka serwatkowe) przeciwko toksyczności kadmu w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

W badaniach *in vitro* zostało określone działanie zróżnicowanych dawek kadmu na hodowlę fibroblastów, do których uprzednio dodano zróżnicowane dawki peptydów kazeinowych lub białek serwatkowych przy użyciu sytemu ECIS (Electric Cell substrate Impedance Sensing), służącego do pomiaru impedancji i określania zachowania komórek w czasie rzeczywistym.

Badania *in vivo* przeprowadzono na 72 szczurach samcach i samicach szczepu Wistar, które zostały losowo podzielone na sześć grup. (T1 - kontrola dodatnia) grupa otrzymująca CdCl<sub>2</sub> i dietę kontrolną, (T2 - kontrola ujemna) grupa otrzymująca wodę filtrowaną i dietę kontrolną, (T3 - kazeina+CdCl<sub>2</sub>), grupa otrzymująca Cd i dietę kazeinową, (T4 - kazeina) grupa otrzymująca wodę filtrowaną i dietę kazeinową, (T5 – białka serwatkowe+CdCl<sub>2</sub>) grupa otrzymująca Cd i dietę na bazie białek serwatkowych, (T6 – białka serwatkowe) grupa otrzymująca wodę filtrowaną i dietę na bazie białek serwatkowych.

Kadm był podawany w wodzie do picia zawierającej 19,4 mM/L CdCl<sub>2</sub> przez okres 10 tygodni. Wszystkie szczury otrzymały dietę kontrolną przez pierwsze 5 tygodni doświadczenia, lecz przez drugie 5 tygodni otrzymywały zróżnicowaną dietę wg. klucza: (T1,T2 – dieta kontrolna), (T3, T4 – dieta kazeinowa), (T5, T6 – dieta na bazie białek serwatkowych).

Badania *in vitro* (ECIS) prowadzono przez okres 20-25 godzin ekspozycji na zróżnicowane stężenia Cd aby obserwować zachowanie się fibroblastów w obecności lub jej braku peptydów kazeinowych i białek serwatkowych w hodowli. Mikroskopowa ocena wykazała postępujące zmiany morfologiczne fibroblastów, które polegały na wczesne obkurczenie się komórek oraz pojawienie się owalnych i okrągłych form fibroblastów w zależności od czasu ekspozycji na kadm. W przeciwieństwie do tego, nie stwierdzono zmian morfologicznych w hodowlach fibroblastów traktowanych wcześniej peptydami kazeinowymi i peptydami białek serwatkowych, co wskazuje na profilaktyczne właściwości przeciwko toksyczności kadmu. Jednakże, peptydy białek serwatkowych wykazały w większym stopniu działanie ochronne niż peptydy kazeinowe.

Badania impedancy przy pomocy ECIS wykazały, że wyższe stężenia kadmu skutkowały szybkimi spadkami jej wartości wskazując na śmierć fibroblastów, podczas

gdy wcześniejsze dodanie do hodowli peptydów kazeinowych i białek serwatkowych znacznie zwiększyło wartość impedancji i chroniło przed toksycznym działaniem kadmu. Można by wysunąć hipotezę, że kadm został związany przez peptydy białek mleka krowiego obecnych w medium, co zapobiegło oddziaływanie kadmu na błonę komórkową fibroblastów.

Podawanie kadmu szczurom w badaniach *in vivo* spowodowało wzrost poziomu wapnia, cholesterolu i triglicerydów w surowicy krwi, zwłaszcza u samic grupy otrzymującej Cd i dietę kontrolną. Natomiast u szczurów otrzymujących Cd i żywionych dietą kazeinową i zawierającą białka serwatkowe poziom cholesterolu i triglicerydów nie uległ zmianom. Ekspozycja szczurów obojga płci na działanie kadmu nie wpłynęła istotnie na wskaźniki krwi. Wyjątek stanowiła liczb krwinek białych i płytek krwi u samic, która wzrosła w grupach żywionych dietą na bazie kazeiny i białek serwatkowych.

Nerki i wątroba szczurów dodatknej grupy kontrolnej wykazały istotnie wyższe stężenia Cd w porównaniu do tych narządów szczurów pozostałych grup. U szczurów żywionych dietą kazeinową i dietą zawierającą białka serwatkowe zaobserwowano względnie niższą akumulację Cd w wątrobie i w nerkach oraz zwiększoną eliminację tego pierwiastka przez sierść i z kałem.

Ekspozycja na Cd wpłynęła na zawartość miedzi w tkankach szczurów, co uwidoczniło się poprzez wyższe stężenia we krwi i w wątrobie osobników obojga płci. Akumulacja Cd w tkankach powiązano z zmniejszoną zawartością miedzi w nerkach oraz zmniejszonym stężeniem cynku w wątrobie.

Chlorek kadmu w stężeniu 19,4 mM/L w wodzie do picia wywarł hepato- i nefrotoczne działanie i spowodował zmiany histopatologiczne w wątrobie i w nerkach. Wątroba szczurów intoksykowanych Cd charakteryzowała nekroza hepatocytów, stłuszczenie, zmiany degeneracyjne i infiltracja komórek zapalnych. Nerki cechowały zmiany ciałek nerkowych, kanalików nerkowych (obkurczanie i degeneracja). Ponadto, Cd spowodował wieloogniskowe wynaczynienia, obrzęk i obstrukcję kanalików w wątrobie i w nerkach. Te uszkodzenia związane z toksycznym działaniem Cd były mniejsze w narządach szczurów żywionych dietą kazeinową i dietą zawierającą białka serwatkowe. Obecne badania dostarczyły dowody, że białka mleka krowiego (kazeina i białka serwatkowe) wywierają protekcyjny wpływ przed toksycznością kadmu u szczurów.

**Słowa kluczowe:** kadm, kazeina, białka serwatkowe, peptydy, ECIS, fibroblasty, wątroba, nerka, sierść