

## ВПЛИВ КАТІОНІВ ХРОМУ (VI) НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В ЕРИТРОЦИТАХ ТВАРИН

Г. Л. Антоняк, О. Б. Скаб

Львівський національний університет ім. І. Франка  
Львівський національний аграрний університет

*У статті представлені результати досліджень активності ферментів енергетичного обміну та антиоксидантної системи в еритроцитах крові щурів, яким вводили біхромат калію ( $K_2Cr_2O_7$ ) щодоби в дозі 3мг/кг маси впродовж 7 і 14 діб. Установлено зниження лактатдегідрогеназної і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активності та підвищення активності ферментів-антиоксидантів — супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази у клітинах тварин, токсикованих катіонами хрому (VI).*

**Ключові слова:** ХРОМ, ЕРИТРОЦИТИ, МЕТАБОЛІЗМ, АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА

Хром — широко розповсюджений у природі метал із змінною валентністю. Залежно від валентного стану цей елемент по-різному впливає на живі організми. У тривалентній формі хром — необхідний компонент системи регуляції функціональної активності рецепторів інсуліну та підсилює вплив гормону на процеси метаболізму [1, 2]. У зв'язку з цим нестача  $Cr^{3+}$  призводить до порушень обміну вуглеводів, ліпідів, білків. Водночас у шестивалентній формі хром є токсичним, мутагенним і канцерогенним чинником [2, 3]. Шкідливу дію  $Cr(VI)$  значною мірою опосередковують активні форми кисню (АФО), які утворюються під час відновлення елемента в організмі та клітинах [2]. АФО активно взаємодіють із клітинними біополімерами, беручи участь у реакціях пероксидного окиснення та пошкодження біомолекул.

Внаслідок широкого застосування елемента в різних галузях промисловості рівень, забруднення навколишнього середовища сполуками шестивалентного хрому зростає, що збільшує ризик надходження їх до організму людини і тварин. Тому актуальною проблемою є дослідження механізмів реалізації токсичних ефектів катіонів  $Cr(VI)$  на рівні клітинного метаболізму. Особливо це стосується впливу  $Cr^{6+}$  на метаболізм в еритроцитах, які виконують в організмі низку життєво важливих функцій, перш за все — транспорт молекул  $O_2$  до тканин і видалення з них  $CO_2$ , завдяки наявності молекул гемоглобіну — головного компонента цих клітин [4, 5]. Як відомо, існує тісний взаємозв'язок між кисень-транспортною функцією гемоглобіну, активністю метаболічних процесів в еритроцитах і функціональним станом їхніх мембран. Метаболічний зв'язок реалізується через проміжні та кінцеві продукти енергетичного обміну, відновлені форми нікотинамідних коферментів (NADH, NADPH), концентрації яких регулюються активністю ферментів гліколізу та пентозофосфатного шляху перетворення моносахаридів [5]. Водночас функціональна активність еритроцитів істотно залежить від їхньої здатності знешкоджувати активні форми кисню за участю компонентів антиоксидантної системи [4].

Отже, дослідження ферментної активності в еритроцитах тварин, токсикованих сполуками шестивалентного хрому, необхідне для вивчення механізмів порушення кисень-транспортної та інших функцій еритроїдних клітин під впливом важких металів. З метою з'ясування впливу катіонів хрому (VI) на функціональну активність еритроцитів проводили дослідження активності ферментів енергетичного обміну та антиоксидантної системи в цих

клітинах за умов тривалого надходження до організму щурів  $\text{Cr}^{6+}$  у формі біхромату калію ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на безпородних білих лабораторних щурах масою 160–180 г, яких утримували на стандартному раціоні за умов віварію. У процесі експерименту тварин поділили на три групи: дві дослідні (по 5 особин у кожній) і контрольна (10 особин). Щурам дослідних груп вводили внутрішньошлунково розчин  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  у дозі 3 мг/кг маси. Тварини однієї з дослідних груп отримували розчин токсиканта впродовж семи діб, а другої — впродовж чотирнадцяти діб. Щури контрольної групи отримували фізіологічний розчин за такою самою схемою. Матеріалом досліджень була периферична кров, яку отримували декапітацією тварин під легким ефірним наркозом. Еритроцити виділяли центрифугуванням крові при 3000 г і трикратним відмиванням від плазми фізрозчином.

У гемолізатах, виготовлених трикратним заморожуванням-відтаюванням водних суспензій еритроцитів, досліджували активність ферментів енергетичного обміну (глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, КФ 1.1.1.49; лактатдегідрогеназа, КФ 1.1.1.27) і антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, КФ 1.15.1.1; каталаза, КФ 1.11.1.6; глутатіонпероксидаза, КФ 1.11.1.9). Лактатдегідрогеназну і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназну активність визначали за допомогою загальноприйнятих спектрофотометричних методів з використанням нікотинамідних коферментів (NADH і NADP, відповідно) [6]. Активність ферментів обчислювали, враховуючи швидкість відновлення або окиснення молекул нікотинамідного кофермента за 1 хв у перерахунку на 1 мг білка. Супероксиддисмутазну активність визначали за рівнем гальмування ферментом процесу відновлення нітросинього тетразолію за присутності NADH і феназинметасульфату [7], глутатіонпероксидазну — за рівнем окиснення молекул глутатіону за присутності гідропероксиду третинного бутілу [8]. Каталазну активність досліджували за швидкістю розпаду гідроген пероксиду [9]. Вміст білка в гемолізатах визначали методом Лоурі і співавторів (1951). Отримані результати опрацьовували статистично з використанням методів варіаційної статистики.

### Результати й обговорення

Наведені на рисанках 1, 2 результати досліджень свідчать про метаболічну відповідь еритроцитів білих щурів на тривале надходження до організму катіонів шестивалентного хрому. Динаміка ферментної активності в цих клітинах значною мірою зумовлена тривалістю експериментального періоду. Так, на 7-му добу після початку введення біхромату калію каталітична активність ферментів енергетичного обміну в еритроцитах тварин знижується ( $p < 0,01$ – $0,001$ ), а особливо — активність лактатдегідрогенази, яка майже повністю інактивується на зазначеній стадії експерименту ( $p < 0,001$ ). При цьому активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроцитах тварин зменшується майже втричі і становить 37 % від контрольних значень ( $p < 0,01$ ). Упродовж подальшого періоду експерименту зміни досліджуваних ферментів енергетичного обміну в еритроцитах щурів неоднакові. Так, на 14-ту добу після початку введення біхромату калію лактатдегідрогеназна активність в еритроцитах піддослідних тварин все ще залишається на низькому рівні і становить 28,2 % від значень, виявлених у щурів контрольної групи, а глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність нормалізується (рис. 1).

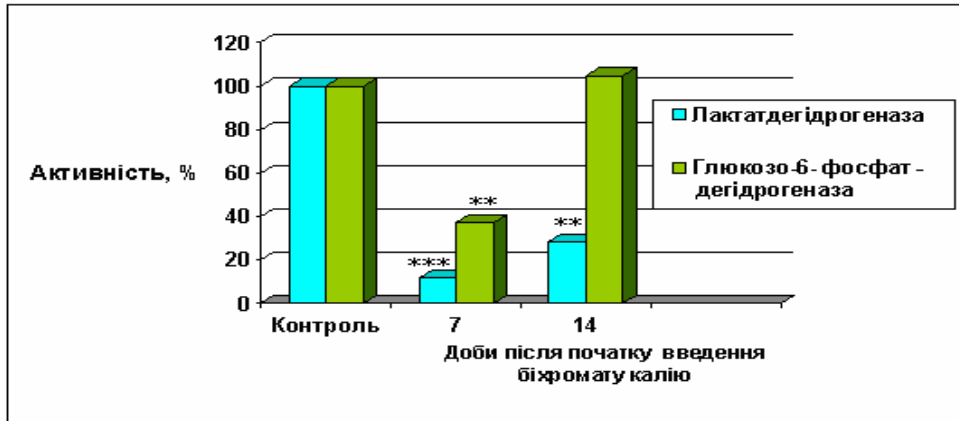


Рис. 1. Лактатдегідрогеназна і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназна активність в еритроцитах щурів, яким вводили біхромат калію впродовж семи і чотирнадцяти діб

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок про неоднакову чутливість ферментів, які каталізують перетворення субстратів у реакціях гліколізу і пентозофосфатного шляху, до впливу шестивалентного хрому. Вірогідно, що установлений ефект віддзеркалює роль різних механізмів у формуванні метаболічної відповіді еритроцитів тварин на тривале введення сполуки важкого металу. Важливу роль у встановлених ефектах може відігравати вплив катіонів  $Cr^{6+}$  на загальну інтенсивність еритропоезу та швидкість надходження до крові молодих еритроїдних клітин, які характеризуються високою активністю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази [4].

З літератури відомо, що надходження сполук хрому (VI) до організму тварин і людини, а також клітин, культивованих *in vitro*, супроводжується відновленням  $Cr^{6+}$  до  $Cr^{3+}$ . Цей процес призводить до утворення активних форм кисню, які характеризуються високою реакційною активністю [2, 10]. За таких умов важливе значення має активність ферментів-антиоксидантів (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, каталаза), які, каталізуючи реакції перетворення АФО до нешкідливих або менш токсичних сполук, попереджують процеси вільнорадикального окиснення та захищають плазматичні мембрани, внутрішньоклітинні структурні компоненти та біомолекули від пошкоджень під впливом екзогенних токсикантів.

Як свідчать отримані результати, введення біхромату калію зумовлює адаптаційне підвищення супероксиддисмутазної активності в еритроцитах піддослідних тварин, особливо після 14-добового експериментального періоду ( $p < 0,001$ ) (рис. 2).

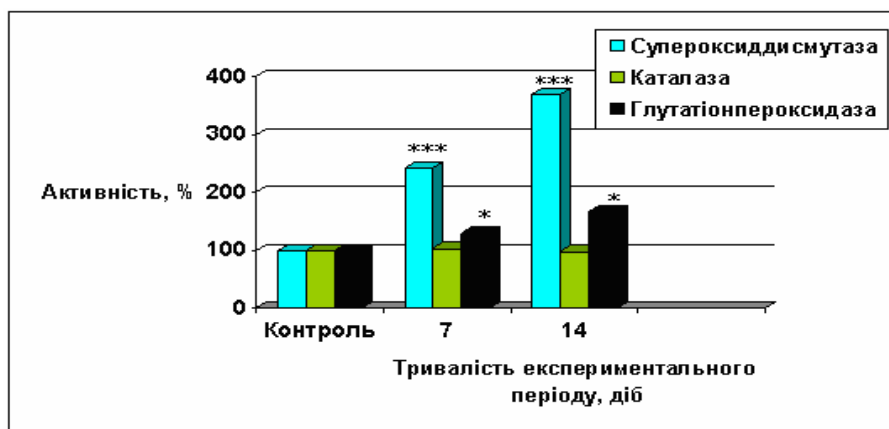


Рис. 2. Активність ферментів антиоксидантної системи в еритроцитах щурів, яким вводили біхромат калію впродовж семи і чотирнадцяти діб

Відомо, що за участю супероксиддисмутази відбувається перетворення супероксид-аніон радикалу, який характеризується високою реакційною активністю, до менш активної сполуки кисню, гідроген пероксиду [11]. Останній може відновлюватись до молекул води в каталазній або глутатіонпероксидазній реакціях. Каталазна активність істотно не змінюється в еритроцитах щурів, яким вводили біхромат калію, однак глутатіонпероксидазна активність вірогідно зростає ( $p < 0,05$ ) впродовж усього експерименту (рис. 2). Отримані дані підтверджують положення про неоднакову роль каталази і глутатіонпероксидази у знешкодженні гідроген пероксиду в клітинах тварин [12].

Загалом отримані результати свідчать, що тривале надходження до організму тварин катіонів  $Cr^{6+}$  зумовлює істотні зміни в метаболічній активності еритроцитів. Перш за все, привертає увагу пригнічення лактатдегідрогенази, яка каталізує процес утворення лактату та віддзеркалює загальну активність гліколізу в клітинах крові. Оскільки анаеробне розщеплення моносахаридів — це єдиний процес, що призводить до утворення молекул АТФ в еритроцитах ссавців [4], то пригнічення активності гліколізу зумовлює порушення енергозабезпечення еритроцитів тварин, отруєних тривалим надходженням важкого металу.

Водночас результати досліджень вказують на важливе значення супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази в механізмах антиоксидантного захисту еритроцитів тварин, токсикованих катіонами  $Cr^{6+}$ .

## **Висновки**

1. За умов тривалого внутрішньошлункового введення катіонів  $Cr^{6+}$  у формі біхромату калію в еритроцитах крові щурів виявляється пригнічення активності ферментів енергетичного обміну: глюкозо-6-фосфатдегідрогенази — через 7 діб, лактатдегідрогенази — через 7 і 14 діб після початку введення тваринам  $K_2Cr_2O_7$ .

2. В еритроцитах токсикованих  $Cr^{6+}$  щурів підвищується активність ферментів-антиоксидантів (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза) впродовж 7- і 14-добового періодів експериментального введення тваринам токсиканта. Вірогідно, цей ефект пов'язаний із адаптаційними змінами в процесах антиоксидантного метаболізму, які відбуваються під час дозрівання еритроїдних клітин.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому дослідження впливу хрому  $Cr^{6+}$  на функціональні показники еритроцитів, зокрема спорідненість гемоглобіну до молекулярного кисню. Будуть проведені дослідження впливу  $Cr^{6+}$  на швидке утворення та руйнування еритроцитів в організмі тварин.

*Н. Л. Antonyak, О. В. Skab*

## **EFFECTS OF CHROMIUM (VI) ON THE ACTIVITY OF ENZYMES OF ENERGY METABOLISM AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN ANIMAL ERYTHROCYTES**

### **S u m m a r y**

The activities of enzymes of energy metabolism and antioxidant system in erythrocytes of rats, which were injected with potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ) in dose 3mg/kg every day for 7 and 14 days, were investigated. It was established, that inhibition of lactate dehydrogenase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities, as well as activation of antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase took place in animal red cells under an influence of  $Cr^{6+}$ .

*Г. Л. Антоняк, О. В. Скаб*

## ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ХРОМА (VI) НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ЖИВОТНЫХ

### А н н о т а ц и я

В статье представлены результаты исследований активности ферментов энергетического обмена и антиоксидантной системы в эритроцитах крови крыс, которым вводили бихромат калия ( $K_2Cr_2O_7$ ) ежедневно в дозе 3 мг/кг массы в течение 7 и 14 суток. Установлено снижение лактатдегидрогеназной и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности и повышение активности ферментов-антиоксидантов — супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в клетках животных, отравленных катионами хрома (VI).

1. *Anderson R. A.* Chromium, glucose intolerance and diabetes / R. A. Anderson // *J. Am. Coll. Nutr.* — 1998. — Vol. 17, N 6. — P. 548–555.

2. *Сологуб Л. І.* Хром в організмі людини і тварин. Біохімічні, імунологічні та екологічні аспекти / Сологуб Л. І., Антоняк Г. Л., Бабич Н. О. — Львів : Євросвіт, 2007. — 127 с.

3. *Hantson P.* Hexavalent chromium ingestion: biological markers of nephrotoxicity and genotoxicity / Hantson P., Van Caenegem O., Decordier I. et al. // *Clin. Toxicol. (Phila.)*. — 2005. — Vol. 43, N 2. — P. 111–112.

4. *Campanella M. E.* Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane / Campanella M. E., Chu H., Low P. S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Vol. 102. — P. 2402–2407.

5. *De Rosa M. C.* Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: new insights in gas transport and metabolic modulation / De Rosa M. C., Alinovi C. C., Galtieri A. et al. // *IUBMB Life.* — 2008. — Vol. 60, N 2. — P. 87–93.

6. *Bergmeyer H. U.* (Ed. In Chief). *Methods of Enzymatic Analysis* / H. U. Bergmeyer, M. Grassl (eds.). — Vol. 3. — Verlag Chemie : Weinheim-Deerfield Beach, Florida-Basel. — 1983. — 500 p.

7. *Дубинина Е. Е.* Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. // *Лаб. Дело.* — 1983. — № 10. — С. 30–33.

8. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / Моин В. М. // *Лаб. Дело.* — 1986. — № 12. — С. 724–727.

9. *Beers R. F.* A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase / Beers R. F., Sizer J. W. // *J. Biol. Chem.* — 1952. — Vol. 195. — P. 133–140.

10. *Bagchi D.* Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells / Bagchi D., Joshi S. S., Bagchi M. et al. // *J Biochem. Mol. Toxicol.* — 2000. — Vol. 14, N 1. — P. 33–41.

11. *Chance B.* Reactive oxygen intermediates in biochemistry / Chance B., Cadenas E. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1986. — 55. — P. 137–166.

12. *Halliwell B.* Free radicals and antioxidants: a personal view / Halliwell B. // *Nutr. Rev.* — 1994. — 52, N 8. — P. 253–265.

**Рецензент:** головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ, д. б. н., професор Янович В. Г.