

Elżbieta Kulikowska-Karpińska*, Dominik Popławski**,
Małgorzata Gałążyn-Sidorczuk***, Joanna Rogalska***

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH I PEROKSYDACJA LIPIDÓW W TRZUSTCE SZCZURÓW NARAŻONYCH NA KADM

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND LIPID PEROXIDATION IN THE PANCREAS OF RATS EXPOSED TO CADMIUM

Słowa kluczowe: kadm, trzustka, enzymy antyoksydacyjne, peroksydacja lipidów.

Key words: cadmium, pancreas, antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

Long-term exposure to cadmium, both environmental and occupational, poses a risk for chronic intoxication. Cadmium has been found to induce lipid peroxidation, to change the activity of antioxidant enzymes and the level of substances that react with thiobarbiturate acid (TBARS) in erythrocytes/serum, brain, liver and kidney of rats in a dose- and time-dependent manner. At present, the free radical theory concerning pathogenesis of chronic pancreatitis has gained substantial interest. It is believed that a chronic inflammatory process is a consequence of persistent oxidative stress. Progressing tissue destruction and emaciation in the course of chronic pancreatitis may result from enhancing deficiency of the antioxidant system in pancreatic acinar cells.

The study objective was to assess the enzymatic antioxidant barrier and lipid peroxidation in the pancreas of rats chronically exposed to cadmium. Male rats (60 animals), of initial body weight $\leq 150g$, were used for the study. They were exposed to cadmium for 6 and 12 months. Cadmium was administered in the form of aqueous solutions of cadmi-

* *Dr hab. Elżbieta Kulikowska-Karpińska – Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Kilińskiego 1, 15-089 Białystok; tel.: 85 748 56 04;
e-mail: ekotoksykologia@wp.pl*

** *Mgr Dominik Popławski – Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 23, 15-950 Białystok; tel.: 85 744 70 05;
e-mail: sekretariat@rckik.bialystok.pl*

****Dr Małgorzata Gałążyn-Sidorczuk, dr Joanna Rogalska – Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Kilińskiego 1, 15-089 Białystok; tel.: 85 748 56 04;
e-mail: toxic@umwb.edu.pl*

um chloride to drink (ad libitum) at concentrations of 5 and 50 mg Cd/l. The control animals were given drinking water. For the whole period of the experiment, the rats had free access to a standard LSM diet. After exposure termination, the animals were anesthetized (Fetbutal) and exsanguinated, and the pancreas was obtained. Flameless atomic-absorption spectrometry (GF AAS) was used to determine cadmium concentration and Bioxytech kits were applied to measure the activities of SOD, CAT, GSH-Px and the levels of GSH, TBARS, H₂O₂ in the pancreas. The pancreas of the rats exposed to cadmium showed its elevated, dose- and exposure time-dependent accumulation. The increase in cadmium content was accompanied by a decrease in the antioxidant enzyme activity and in GSH level and a rise in TBARS and H₂O₂ which were also dose and exposure time dependent.

1. WPROWADZENIE

Kadm ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne i duże skażenie środowiska został zaliczony do metali ciężkich silnie toksycznych. Jest on uważany za truciznę zawodową i środowiskową ze względu na wysoką zdolnością do akumulacji w organizmie i długi okres półtrwania (10–30 lat) [Kulikowska-Karpińska 2004b]. O ile objawy toksycznego działania kadmu zostały dobrze poznane i opisane to mechanizm toksycznego działania tego metalu nie został w pełni wyjaśniony. Badania przeprowadzone w ostatnich latach dowodzą, że jednym z mechanizmów toksycznego działania kadmu jest powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT). Uważa się, że następstwem działania RFT lub wolnych rodników jest załamanie się bariery antyoksydacyjnej.

Długotrwałe narażenie na kadm stwarza ryzyko wystąpienia zatruć przewlekłych. W badaniach własnych i innych autorów wykazano, że kadm zależnie od dawki i czasu narażenia indukuje peroksydację lipidów, zmienia aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w erytrocytach/surowicy, mózgu, wątrobie i nerce szczurów [Jurczuk 2004, Kulikowska-Karpińska 2004b]. Obecnie dużą uwagę zwraca się na wolnorodnikową teorię patogenezy przewlekłego zapalenia trzustki. Uważa się, że przewlekły proces zapalny jest konsekwencją utrzymującego się przewlekłego stresu oksydacyjnego. Postępująca destrukcja i wyniszczenie tkanek w przebiegu przewlekłego zapalenia trzustki mogą wynikać z pogłębiającego się deficytu układu antyoksydacyjnego w komórkach pęcherzykowych trzustki [Karihtala 2007].

2. CEL BADAŃ

Celem badań była ocena enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej i peroksydacji lipidów w trzustce szczurów przewlekłe narażanych na kadm.

3. MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na szczurach, samcach rasy Wistar (CRL:(WI)BR) o masie 150 ± 20 g, w 8 grupach doświadczalnych po 8 zwierząt w każdej. Zwierzęta narażano na kadm w stężeniu 5 i 50 mg/l przez okres 6 i 12 miesięcy. Kadm podawano w postaci chlorku kadmu w roztworach wodnych do picia *ad libitum*. Szczury z grup kontrolnych otrzymywały do picia wodę pitną. Przez cały okres doświadczenia zwierzęta miały swobodny dostęp do wody pitnej (kontrola), wodnych roztworów kadmu (grupy narażone) oraz paszy. Szczury karmiono granulowaną paszą standardową typu LSM (Motycz). Po zakończeniu ekspozycji zwierzęta usypiano (Fetbital), skrwawiono i pobierano trzustkę. W trzustce oznaczano stężenie kadmu metodą bezpłomieniowej spektrometrii atomowo-absorpcyjnej z elektrotermiczną atomizacją w kuwecie grafitowej (AAS GF) [Pinta 1990], aktywność katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GSH-Px) a także stężenie glutationu (GSH), substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) i nadtlenu wodoru (H_2O_2) – zestawami firmy Bioxytech. Stężenie białka w homogenatach trzustki oznaczano metodą Lowry [Lowry 1951]. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu U-Manna-Whitneya. Test ten jest nieparametryczną formą testu t-Studenta dla zmiennych niezależnych o podobnej interpretacji. Różnice między grupami przyjęto za statystycznie znamienne przy $p < 0,05$. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu pakietu statystycznego Statistika 5.1.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

Kadm podawano drogą doustną, ponieważ dla populacji generalnej jest to jedna z podstawowych dróg narażenia na ten metal. Dobowy napływ kadmu do organizmu szczura eksponowanego na 5 mg Cd/l odpowiada ilości tego pierwiastka, jaka może dostać się do organizmu człowieka w warunkach narażenia środowiskowego. Dobowe spożycie kadmu przez szczury w stężeniu 50 mg Cd/l odpowiada ilości tego pierwiastka, która dostaje się do organizmu w warunkach narażenia zawodowego.

Stężenie kadmu oraz aktywność SOD, CAT i GSH-Px w trzustce szczurów narażonych na kadm przedstawia tabela 1. W trzustce szczurów narażonych na kadm stwierdzono, wzrost kumulacji kadmu, zależny od dawki i czasu ekspozycji. Największy, bo ponad 12-krotny wzrost stężenia kadmu odnotowano w grupie szczurów eksponowanych na 50 mg Cd/l przez 12 miesięcy. Na absorpcję i rozmieszczenie kadmu w tkankach istotnie wpływa rodzaj i postać chemiczna związku, wielkość dawki, czas ekspozycji oraz droga wprowadzania do organizmu. Uważa się, że kumulacja kadmu w tkankach jest większa po narażeniu na kadm w postaci nieorganicznej soli $CdCl_2$, niż w formie organicznego kompleksu CdMT [Liu 1998].

Narażenie szczurów na kadm w stężeniu 5 mg Cd/l przez 6 miesięcy powodowało obniżenie aktywności SOD o 23% w stosunku do wartości kontroli. Aktywności CAT i peroksydazy glutationowej GSH-Px nie uległy zmianie i utrzymywały się na poziomie wartości kontrolnych. Sześciomiesięczna ekspozycja zwierząt na kadm w stężeniu 50 mg Cd/l prowadziła do wzrostu aktywności CAT o 31% i obniżenia aktywności SOD o 63% w stosunku do kontroli. Dwunastomiesięczna ekspozycja na kadm zarówno w stężeniu niskim (5 mg Cd/l), jak i wysokim (50 mg Cd/l) prowadziła do obniżenia aktywności wszystkich badanych enzymów antyoksydacyjnych.

Obniżenie aktywności SOD o 25%, GSH-Px o 35% i CAT o 46% w stosunku do wartości kontroli uzyskano w trzustce zwierząt narażanych na niskie stężenie kadmu. Największe, bo wynoszące ponad 50%, obniżenie aktywności wszystkich badanych enzymów (SOD, CAT i GSH-Px) odnotowano po narażeniu na wysokie stężenie kadmu (tab. 1).

Tabela 1. Wpływ kadmu (Cd) na aktywność SOD, CAT, GSH-Px i stężenie kadmu w trzustce szczurów

Table 1. The influence of cadmium on the activity of SOD, CAT and GSH-Px in the pancreas of rats

Grupa	Cd [μg/g tkanki]	SOD [U/mg białka]	CAT [U/mg białka]	GSH-Px [U/mg białka]
6 miesięcy				
Kontrola	0,015±0,0027	139,00±12,00	129,60±15,25	11,40±1,52
Cd 5	0,030±0,0028 ^a	106,50±11,35 ^a	128,10±14,15	11,20±1,35
Cd 50	0,127±0,0210 ^{a,b}	51,00±7,80 ^{a,b}	170,40±23,40 ^{a,b}	10,30±1,80
12 miesięcy				
Kontrola	0,018±0,0031	135,25±14,10	120,50±16,20	11,44±0,80
Cd 5	0,035±0,004 ^{a,c}	101,20±10,50 ^{a,c}	65,10±11,70 ^{a,b,c}	7,45±0,80 ^{a,b,c}
Cd 50	0,220±0,036 ^{a,b,c,d}	50,55±6,70 ^{a,b,c,d}	54,60±8,55 ^{a,b,c,d}	5,50±0,90 ^{a,b,c,d}

UWAGA: Istotnie statystycznie przy $p < 0,05$ do: a – kontroli; b – grupy Cd 5 (6 miesięcy); c – grupy Cd 50 (6 miesięcy); d – grupy Cd 5 (12 miesięcy); e – grupy Cd 50 (12 miesięcy).

Stężenie GSH, H_2O_2 i TBARS w trzustce szczurów ekspozowanych przewlekle na kadm przedstawia tabela 2. Kadm w stężeniu 5 mg/l podawany szczurom przez 6 miesięcy nie wpływał istotnie na stężenie GSH i H_2O_2 , podwyższał natomiast 3-krotnie stężenie TBARS. W trzustce szczurów narażanych na 50 mg Cd/l stwierdzono początkowo wzrost (6 miesięcy), a następnie obniżenie (12 miesiącach) stężenia GSH. Kadm w wysokim stężeniu podawany przez 12 miesięcy powodował istotny wzrost stężenia H_2O_2 i TBARS w trzustce szczurów.

Tabela 2. Wpływ kadmu na stężenie GSH, H₂O₂ i TBARS w trzustce szczurów**Table 2.** The influence of cadmium on the concentration of GSH, H₂O₂ and TBARS in the pancreas of rats

Grupa	GSH [μM/mg białka]	H ₂ O ₂ [μM/mg białka]	TBARS [μM/mg białka]
6 miesięcy			
Kontrola	12,60±1,70	43,55±5,25	4,27±0,60
Cd 5	13,70±2,10	46,70±4,15	12,50±1,45 ^a
Cd 50	18,00±2,30 ^{a,b}	59,80±3,40 ^{a,b}	16,60±1,70 ^{a,b}
12 miesięcy			
Kontrola	12,15±1,43	49,50±6,20	5,20±0,80
Cd 5	9,00±1,46 ^{a,b,c}	70,40±11,70 ^{a,b,c}	18,50±2,35 ^{a,b}
Cd 50	7,10±1,18 ^{a,b,c}	80,60±8,55 ^{a,b,c}	20,70±3,80 ^{a,b,c}

UWAGA: Istotnie statystycznie przy p<0,05 do: a – kontroli; b – grupy Cd 5 (6 miesięcy); c – grupy Cd 50 (6 miesięcy); d – grupy Cd 5 (12 miesięcy); e – grupy Cd 50 (12 miesięcy).

Trzy badane enzymy – SOD, GSH-Px i CAT – stanowią podstawową obronę enzymatyczną przed wolnymi rodnikami i ich nierodnikowymi pochodnymi. Chronią one zarówno komórki, jak i obszary pozakomórkowe, przed szkodliwym działaniem nadmiaru wolnych rodników powstających w patologicznych procesach, takich jak: zapalenie, niedokrwienie, reperfuza, udar czy procesy transplantacji narządów. Utrzymują również równowagę pro- i antyoksydacyjną w przypadku chorób, w których dochodzi do zwiększonego wytwarzania wolnych rodników tlenowych [Karihtala 2007, Valko 2007]. Dysmutaza ponadtlenkowa jest enzymem, który katalizuje reakcje dysmutacji anionrodnika ponadtlenkowego i prowadzi do powstania nadtlenu wodoru [Bartosz 2004]. Katalaza wykazuje powinowactwo do wolnych cząsteczek nadtlenu wodoru. W wyniku jej działania dwie cząsteczki H₂O₂ są przekształcane do dwóch cząsteczek wody i cząsteczki tlenu. Katalazy wykazują dwie aktywności: katalazową przy wysokim stężeniu nadtlenu wodoru i peroksydazową przy niskim stężeniu H₂O₂. W warunkach fizjologicznych katalaza kontroluje stężenie H₂O₂, zapobiega jego nagromadzeniu się w komórkach i przeciwdziała uszkodzeniom oksydacyjnym [Kulikowska-Karpińska 2004a]. Z kolei GSH-Px katalizuje reakcję pomiędzy GSH a H₂O₂, lub innymi nadtlenkami, w wyniku której powstaje utleniona forma glutationu, czyli disulfid glutationu (GSSG). Peroksydaza glutationowa również kontroluje szybkość peroksydacji lipidów i chroni błony komórkowe przed peroksydacyjnym uszkodzeniem.

Głównym składnikiem nieenzymatycznej bariery antyoksydacyjnej jest GSH. Utrzymanie prawidłowego poziomu GSH w komórce jest bardzo ważne, ze względu na rolę, jaką pełni w komórce. Chroni on białka i lipidy błon organelli komórkowych przed szkodliwym wpływem RFT [Łukaszewicz-Hussain 2003]. Bierze udział w detoksykacji ksenobiotyków, jest magazynem cysteiny, utrzymuje grupy-SH białek w stanie zredukowanym. Szczególnie ważną rolę glutationu jest utrzymanie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w komórce,

a także usuwanie H_2O_2 w reakcji katalizowanej przez GSH-Px, sam również posiada zdolność redukcji [Stohs 2001]. Produktem tej przemiany jest utlenienie glutationu i powstanie disulfidu (GSSG). Tworzenie dużych ilości disulfidu glutationu jest dla komórki bardzo niebezpieczne. Disulfid GSSG posiada zdolność tworzenia z białkami zawierającymi grupy tiolowe mieszaniny disulfidów, może również utleniać grupy tiolowe białek, co w rezultacie prowadzi do ich inaktywacji [Dringer 2000, Jo 2001]. Odpowiedni poziom GSH w komórce pozwala na zachowanie funkcji mitochondriów, utrzymanie homeostazy wapnia, aktywności enzymów zawierających grupy SH oraz struktury i integralności błon mitochondrialnych [Bartosz 2004].

5. PODSUMOWANIE

Przewlekła ekspozycja na kadm prowadzi do akumulacji kadmu w trzustce. Wraz ze wzrostem stężenia kadmu w narządzie stwierdzono, obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT i GSH-Px) i stężenia GSH, a także wzrost poziomu TBARS i H_2O_2 zależnie od dawki kadmu i czasu ekspozycji. Zmiany badanych parametrów świadczą o załamaniu się bariery antyoksydacyjnej w trzustce szczurów. Obserwowane w przewlekłym narażeniu na kadm, jednoczesne obniżenie poziomu GSH i wzrost stężenia TBARS i H_2O_2 może prowadzić do uszkodzenia narządu.

Badania finansowano w ramach pracy statutowej nr 3-21467.

PIŚMIENNICTWO

- BARTOSZ G. 2004. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa.
- DRINGER R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. 62: 649–671.
- DUMASWALA U.J., ZHUO L., JACOBSON D.W., SUSHIL K.J., SUKALSKI K.A. 1999. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. Free Radic. Biol. Med. 27: 1041–1049.
- JO S.H., SON M.K., KOH H.J., LEE S.M., SONG I.H., KIM Y.O., LEE Y.S., LEONG K.S., KIM W.B., PARK J.W., SONG B.J., HUH T.L. 2001. Control of mitochondria redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondria NADP⁺ – dependent isocitrate dehydrogenase (IDPm). J. Biol. Chem. 276: 16168–16176.
- JURCZUK M., BRZÓSKA M.M., MONIUSZKO-JAKONIUK J., GAŁAŻYŃ-SIDORCZUK M., KULIKOWSKA-KARPIŃSKA E. 2004. Antioxidant enzymem activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats expose to cadmium and etanol. Food Chem. Toxicol. 42: 429–438.
- KULIKOWSKA-KARPIŃSKA E., MONIUSZKO-JAKONIUK J. 2004a. The antioxidative barrier in the organism. Pol. J. Environ. Stud. 13 (1): 5–13.

- KULIKOWSKA-KARPIŃSKA E. 2004b. Wpływ cynku na procesy oksydacyjno-redukcyjne zachodzące w ustroju szczura narażonego na różne stężenia kadmu i cynku – Rozprawa Habilitacyjna, Białystok, ISBN 83-86796-78-2.
- KARIHTALA P., SOINI YLERMI. 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*. 115: 81–103.
- LIU J., HABEEBU S.S., LIU Y., KLAASSEN C.D. 1998. Acute CdMT injection is not a good model to study chronic Cd nephropathy: comparison of chronic CdCl₂ and CdMT exposure with acute CdMT injection in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153: 48–58.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., RANDALL R.J. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–268.
- ŁUKASZEWICZ-HUSSAIN A. 2003. Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu. *Med. Pr.* 54: 473–479.
- PINTA M. 1990. Absorpcyjna spektrometria atomowa – zastosowanie w analizie chemicznej. PWN, Warszawa.
- STOHS S. J., BAGCHI D., HASSOUN E., BAGCHI M. 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20: 77–88.
- VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44–84.