

УДК 546.48: 577.12: 611.018.51

Лілія БІЛЕЦЬКА¹, Галина АНТОНЯК²

ВПЛИВ ІНТОКСИКАЦІЇ КАТІОНАМИ КАДМІЮ НА ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У КЛІТИНАХ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ

¹Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
вул. Пекарська, 69, 79010 Львів, Україна

²Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, 79005 Львів, Україна

Вивчали вплив тривалого перорального введення хлориду кадмію ($CdCl_2$) на процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та активність ензимів антиоксидантної системи у сумарній популяції і у фракції мієлоїдних клітин кісткового мозку щурів. Показано, що систематичне щоденне введення $CdCl_2$ в дозі 3 мг/кг зумовлювало підвищення вмісту ТБК-реактивних продуктів в обох досліджуваних фракціях клітин протягом експериментального періоду, починаючи від 7-ї по 21-шу доби. Інтенсифікація процесів ПОЛ призводила до вірогідного підвищення активності ензимів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази) у мієлоїдних клітинах кісткового мозку на початкових етапах експерименту (7-ма доба від початку введення) із поступовим зниженням активності цих ензимів на 14-ту та 21-шу доби від початку введення токсиканту. Подібні співвідношення між вмістом ТБК-реактивних продуктів та активністю ензимів антиоксидантної системи виявлені також у сумарній популяції клітин кісткового мозку щурів. Разом з тим, рівень активації ензимів-антиоксидантів у даній популяції був у 1,3–1,5 рази нижчий, ніж у фракції мієлоїдних клітин. Встановлені ефекти можуть бути зумовлені гетерогенністю типів клітин, що входять до складу кровотворної тканини і по-різному реагують на оксидативний стрес, зумовлений катіонами Кадмію.

Ключові слова: клітини кісткового мозку, кадмій, пероксидне окиснення ліпідів, ферменти антиоксидантної системи.

Шкідливі ефекти при інтоксикації катіонами Кадмію у значній мірі обумовлені гемо- та імунотоксичністю, особливо за умов тривалого надходження цього елемента в організм людини і тварин [1]. Відомо, катіони Кадмію можуть акумулюватися в клітинах крові, зокрема лейкоцитах, а також в органах гемопоезу [2]. Нездатність до синтезу металотіонеїнів майже в 10 разів підвищує чутливість системи кровотворення до впливу Кадмію, гемотоксичні ефекти виявляються за умов введення Cd 0,1 мг/кг і менше [3]. Встановлено, що за умов експериментального

введення тваринам Кадмій інтенсивно накопичується в кістковому мозку, зумовлюючи його гіперплазію та інші пошкодження [4]. Таким чином, клітини з високим вмістом Кадмію можуть поступово надходити в кров з органів гемопоєзу після припинення поступлення цього елемента у організм [5].

Кадмій проявляє залежний від дози і тривалості надходження вплив на процеси проліферації і диференціювання лейкоцитів, надходження їх у русло крові та функціональну активність цих клітин в організмі людини й експериментальних тварин [6].

З огляду на значну вразливість ензимів антиоксидантної системи лейкоцитів крові до дії катіонів Кадмію представляє інтерес з'ясування впливу цього елемента на процес пероксидного окиснення і активність ензимів-антиоксидантів у клітинах органів лейкопоєзу.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проводили на нелінійних білих лабораторних щурах самцях масою 160–180 г, яких утримували на змішаному раціоні віварію.

У роботі з тваринами дотримувались “Загальних принципів роботи на тваринах”, затверджених I Національним конгресом по біоетиці (Київ, 2001).

Щурам груп Д1–Д3 вводили зондом у шлунок розчин кадмію хлориду щодоби в дозі 3 мг/кг маси (що становить 1,84 мг Cd^{2+}/kg) упродовж 7-ми, 14-ти і 21-ї діб, відповідно. Тваринам контрольної групи (К) вводили в шлунок фізіологічний розчин за аналогічною схемою.

Об'єктом досліджень служила кровотворна тканина кісткового мозку, яку отримували після етаназії тварин декапітацією під легким ефірним наркозом на 7-, 14- і 21-у доби після початку введення кадмію хлориду. Тканину кісткового мозку виділяли із стегнових кісток, вимиваючи її розчином А (0,3 М лактоза, 0,15 М NaCl, 2 мМ ЕДТА, 5 мМ $MgCl_2$) [7]. Тканину кісткового мозку дезінтегрували і суспендували у десятикратному об'ємі цього розчину за допомогою шприца і голки №25, фільтрували через потрібний шар нейлону для усунення агрегатів клітин і центрифугували впродовж 5 хв при 3000 g. Осад клітин тричі промивали розчином А центрифугуванням в такому ж режимі. Отримані клітини суспендували і проводили їх фракціонування шляхом центрифугування на градієнті густини фікол-верографіну [8].

З цієї метою у пробірки вносили по 2 мл розчину суміші фіколу із верографіном з питомою густиною 1,03; 1,07; 1,09 г/см³. Після цього наносили суспензію клітин кісткового мозку і центрифугували при 1200 g впродовж 10 хв із застосуванням ротора з відкидними стаканами. Для досліджень відбирали фракцію клітин, яка містилася всередині шару з питомою густиною 1,09 г/см³ і, за даними цитологічного аналізу містила 80–90% мієлокаріоцитів. Цитологічний аналіз здійснювали за допомогою загальноприйнятої методики [9].

Лізис мієлоїдних клітин кісткового мозку здійснювали у 2,5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, з подальшим трикратним заморожуванням- в рідкому азоті і відтаюванням. Лізати центрифугували при 15000 g впродовж 30 хв при 4 °С.

У лізатах визначали активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, каталази), вміст малонового діальдегіду та гідроперекисів ліпідів. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за рівнем гальмування реакції відновлення нітросинього тетразолію в присутності NADH і феназинметосульфату [10]. Активність глутатіонредук-

тази – за швидкістю відновлення глутатіону в присутності NADPH [11], глутатіонпероксидази – за швидкістю окисації глутатіону в присутності гідропероксиду третинного бутилу [12], активність катализи визначали за методом [13]. Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали методом, в основі якого лежить реакція між МДА і тіобарбітуровою кислотою [14], гідроперекисів ліпідів – з використанням тіоціанату амонію [15]. Вміст білка в лізатах визначали за методом Лоурі (1951). Отримані результати опрацьовували статистично з використанням методів варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення

Отримані результати свідчать, що як у нефракціонованих, так і мієлоїдних клітинах кісткового мозку мало місце вірогідне підвищення утворення продуктів ПОЛ впродовж усього експериментального періоду, від 7-ї по 21-шу доби введення тваринам CdCl_2 (таблиця 1). Слід, однак, зазначити, що у сумарній популяції нефракціонованих клітин кісткового мозку вміст ТБК-реактивних продуктів зростає майже в 2 рази порівняно з контролем вже на 7-ту добу введення токсиканта, тоді як в ізольованих мієлоїдних клітинах таке підвищення спостерігалось тільки на 14-ту добу введення CdCl_2 .

Таблиця 1

Концентрація ТБК-реактивних продуктів у клітинах кісткового мозку щурів, яким вводили в шлунок кадмію хлорид ($M \pm m$, $n=5$)

Клітини	Контроль	Тривалість введення хлориду кадмію (доби)		
		7	14	21
Сумарна популяція клітин	89,10±3,40	144,30±10,05*	116,30±4,21*	123,80±6,10*
Фракція мієлоїдних клітин	90,69±4,16	124,80±8,26*	202,00±14,20*	139,60±5,72*

Примітка: * – вірогідна різниця у показниках між контрольною і дослідною групами тварин ($p < 0,05$); концентрацію ТБК-активних продуктів у клітинах кісткового мозку виражали у нмолях/10⁷ клітин.

Встановлені зміни процесів ПОЛ супроводжувались характерними змінами антиоксидантного статусу досліджуваних клітин, яким вводили CdCl_2 . Особливо виразні порушення активності ензимів антиоксидантної системи спостерігались у мієлоїдних клітинах кісткового мозку (табл. 2). Так, після семи діб введення шуррам кадмію хлориду виявлено зростання супероксид-дисмутазної, каталазної, глутатіонпероксидазної і глутатіонредуктазної активності, відповідно у 3,2; 2,2; 1,9 і 2,8 рази порівняно з контролем ($p < 0,001$).

Можна припустити, що на цій стадії інтоксикації відбувається, з одного боку, активне утворення супероксид-аніон радикалу, а з другого – детоксикація цього та інших реакційно активних метаболітів Оксигену за участю ферментів-антиоксидантів. Однак, незважаючи на активацію ензимів антиоксидантної системи, вміст ТБК-реактивних продуктів у мієлоїдних клітинах тварин у цей період інтоксикації катіонами Кадмію був підвищений ($p < 0,05$), (табл. 1).

При продовженні введення кадмію хлориду до 14 діб у мієлоїдних клітинах спостерігалось різке зменшення активності ензимів, які беруть участь у нейтралізації гідроген пероксиду: катализи – у 3,0 рази ($p < 0,05$), глутатіонпероксидази – у 1,8 раз. Активність СОД і глутатіонредуктази на цій стадії інтоксикації наближа-

лась до значень у контрольній групі. Подальше продовження введення кадмію хлориду зумовлювало нормалізацію супероксид-дисмутазної і каталазної активності, активність глутатіонпероксидази залишалась на підвищеному рівні ($p < 0,05$). Такий ефект може бути зумовлений тим, що при значній тривалості введення Кадмію в клітинах кісткового мозку зростає рівень утворення гідропероксидів ліпідів, які активують глутатіонпероксидазу. Вміст ТБК-реактивних продуктів у цей період перевищував контрольні значення.

Таблиця 2

Активність ензимів антиоксидантної системи в клітинах кісткового мозку щурів, яким вводили в шлунок кадмію хлорид ($M \pm m$, $n=5$)

Клітини	Контроль	Введення хлориду кадмію, діб		
		7	14	21
Супероксиддисмутаза (умовні од./хв. на 1 мг білка)				
Кісткового мозку (нефракціоновані)	0,87±0,06	1,25±0,09*	0,98±0,06	1,13±0,09
Фракція мієлоїдних клітин	0,98±0,07	3,12±0,22**	1,09±0,09	0,94±0,07
Каталаза (нг H ₂ O ₂ /хв на 1 мг білка)				
Кісткового мозку (нефракціоновані)	15,90±0,96	21,05±1,28*	8,62±0,74*	4,48±0,17*
Фракція мієлоїдних клітин	9,04±0,38	20,21±1,40*	2,96±0,21*	8,10±0,58
Глутатіонпероксидаза (нмоль глутатіону/хв. на 1 мг білка)				
Кісткового мозку (нефракціоновані)	190,00±8,44	235,1±14,00*	273,6±15,2*	249,00±20,50*
Фракція мієлоїдних клітин	80,55±3,60	158,8±10,26**	45,1±3,23*	123,90±9,81*
Глутатіонредуктаза (нмоль NADPH /хв. на 1 мг білка,)				
Кісткового мозку (нефракціоновані)	7,60±0,28	11,10±0,78*	10,80±0,62*	–
Фракція мієлоїдних клітин	5,75±0,41	16,33±1,30*	4,62±0,20	–

Примітка: * – вірогідність різниці у показниках між контрольною і дослідною групами тварин ($p < 0,05$).

Подібні співвідношення між вмістом ТБК-реактивних продуктів і активністю ензимів антиоксидантної системи виявлені і у сумарній популяції нефракціонованих клітин кісткового мозку щурів, яким вводили CdCl₂. Рівень активації ензимів – антиоксидантів у них, однак, значно нижчий (у 1,3–1,5 раз), ніж у мієлоїдних клітинах. Можливо, у зв'язку з цим вміст ТБК-активних продуктів у нефракціонованих клітинах кісткового мозку на початкових стадіях інтоксикації тварин, яким вводили кадмію хлорид упродовж семи діб, досягав вищих величин, ніж на інших стадіях експерименту.

Висновки

При тривалій інтоксикації білих щурів шляхом перорального введення кадмію хлориду спостерігається активація процесів пероксидного окиснення ліпідів у клі-

тинах кіткового мозку, що проявляється у зростанні вмісту ТБК-реактивних продуктів у мієлоїдних клітинах і сумарній популяції клітин кісткового мозку впродовж усього експерименту.

При введенні шраам кадмію хлориду впродовж семи діб виявлено зростання активності супероксид-дисмутази, каталази, глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази в обох досліджуваних фракціях клітин, однак ступінь активації цих ензимів у сумарній популяції клітин кісткового мозку у 1,3–1,5 раз нижчий, ніж у ізольованих мієлоїдних клітин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Baykov B., Gudova M., Stoyanov M. Designing an artificial ecological mesocosm for the study of Cd and Pb impact on the immune system of experimental animals // *Toxicol. Let.* – 1996. – Vol. 89. – P. 5–10.
2. Celik A., Büyükkakilli B., Cimen B., Taşdelen B., Oztürk M.I., Eke D. Assessment of cadmium genotoxicity in peripheral blood and bone marrow tissues of male Wistar rats // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2009. – Vol. 19, N 2. – P. 135–140.
3. Liu J., Liu Y., Habeebu S.S., Klaasen C.D. Metallothionein-null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic CdCl₂ exposure // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 159, № 1. – P. 98–108.
4. Nunia V., Goyal P.K. Protective effect of diltiazem (a calcium channel blocker) against cadmium-induced toxicity in mice // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* – 2007. – Vol. 26, N 3. – P. 185–193.
5. Min K.S., Ohyanagi N., Ohta M. et al. Effect of erythropoiesis on splenic cadmium-metallothionein level following an injection of CdCl₂ in mice // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 134, № 2. – P. 235–240.
6. Mackova N.O., Lenikova S., Fedorocko P. Effects of cadmium on haemopoiesis in irradiated and non-irradiated mice: 2. Relationship to the number of circulating blood cells and haemopoiesis // *Physiol. Res.* – 1996. – Vol. 45, № 2. – P. 101–106.
7. Mishell B.B., Shiigi S.M. Selected Methods in Cellular Immunology // W.H. Freeman and Company, San Francisco. – 1980. – 486 p.
8. Сибирная Н.А. Метод фракционирования клеток костного мозга в градиенте плотности смесей фикоλλα и верографина / Н.А. Сибирная, Б.Ф. Сухомлинов, М.В. Хмиль // *Лаб. дело.* – 1991. – № 4. – С. 24–25.
9. Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А., Привольнев Т.И. Гематология животных и рыб / М.: Колос. – 1969. – 240 с.
10. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // *Лаб. дело.* – 1983. – № 10. – С. 30–33.
11. Pinto R.E., Bartley W. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates // *Biochem. J.* – 1969. – Vol. 112, № 1. – P. 109–115.
12. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатіонпероксидази в эритроцитах // *Лаб. дело.* – 1986. – № 12. – С. 724–727.
13. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–18.
14. Коробейников Е.Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // *Лаб. дело.* – 1989. – № 7. – С. 8–9.

15. *Орехович В.Н.* Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – 391 с.

SUMMARY

Liliya BILETSKA¹, Galina ANTONYAK²

EFFECT OF INTOXICATION WITH CADMIUM CATIONS UPON PROCESSES OF PEROXIDE OXIDATION OF LIPIDS AND ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDATIVE SYSTEM IN CELLS OF RAT BONE MARROW

¹*Danylo Halytskyi National Medical University of Lviv,
Pekarska str., 69, 79010 Lviv, Ukraine*

²*Ivan Franko National University of Lviv,
Hrushevskoho str., 4, 79005, Lviv, Ukraine*

The effect of prolonged oral intoxication with cadmium chloride upon processes of peroxide oxidation of lipids (POL) and the activity of enzymes of antioxidative system in cells of total population and in fraction of myeloid cells of rat bone marrow was studied. It was revealed, that every day application of CdCl₂ in dose 3 mg/kg caused the increase in content of TBA-reactive products in both cell fractions studied during all period of the experiment, from the 7-th up to 21-st days. The intensification of POL processes led also to a significant increase in activity of enzymes of antioxidative system (superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxidase) in myeloid cells of bone marrow in the initial stages of the experiment (the 7-th day after start of application) with a gradual decrease of activity of these enzymes in the 14-th and 21-st days. Similar interrelations between the level of TBA-reactive products and the activity of enzymes of antioxidative system were observed in total population of cells of rat bone marrow. Never the less the activity of antioxidant enzymes in this population was 1.3–1.5 times lower then in the fraction of myeloid cells. The observed effects can depend from the heterogenous types of cells composing hemopoietic tissue and responding differentially to oxidative stress induced by cadmium ions.

Keywords: bone marrow cells, cadmium, peroxide oxidation of lipids, enzymes of antioxidative system

РЕЗЮМЕ

Лілія БИЛЕЦКАЯ¹, Галина АНТОНЯК²

ВЛИЯНИЕ ИНТОКСИКАЦИИ КАТІОНАМИ КАДМІЯ НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

¹*Львовский национальный медицинский университет имени Даниила Галицкого,
ул. Пекарская, 69, 79010 Львов, Украина*

²*Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, 79005 Львов, Украина*

Изучали влияние продолжительного перорального введения хлорида кадмия на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность ферментов антиоксидантной системы в суммарной популяции и во фракции миелоидных клеток костного мозга крыс. Показано, что ежедневное введение CdCl₂ в дозе 3 мг/кг вызывало повышение содержания ТБК-реактивных продуктов в обеих исследованных фракциях клеток на протяжении всего экспериментального периода, начиная с 7 по 21 сутки. Интенсификация процессов ПОЛ приводила к достоверному повышению активности ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы) в миелоидных клетках костного мозга в начальном периоде эксперимента (7-е сутки от начала введения) с постепенным снижением активности этих ферментов на 14 и 21 сутки от начала введения токсиканта. Подобные

соотношения между содержанием ТБК-реактивных продуктов и активностью ферментов антиоксидантной системы проявлялись также в суммарной популяции клеток костного мозга крыс. Вместе с тем, уровень активации ферментов-антиоксидантов в данной популяции был в 1,3 – 1,5 раз ниже, чем во фракции миелоидных клеток. Выявленные эффекты могут быть обусловлены гетерогенностью типов клеток, входящих в состав кроветворной ткани, по-разному реагирующих на индуцированный катионами кадмия оксидативный стресс.

Ключевые слова: клетки костного мозга, кадмий, перекисное окисление липидов, ферменты антиоксидантной системы.

Надійшла: 08.02.2013.

Після доопрацювання: 14.02.2013.

Прийнята до друку: 20.02.2013.