

## **ГЛУТАТІОНОВА АНТИПЕРОКСИДНА СИСТЕМА В КРОВІ ТА ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ЦИТРАТУ НАНОХРОМУ**

**Інститут біології тварин НААН (м. Львів)**

Дослідження виконані в рамках завдання «Вивчити механізми субстратної регуляції метаболічних процесів у тварин в різні періоди онтогенезу залежно від рівня живлення» (ДР № 0111U006159) за етапом «Вплив наноформи цитрату хрому на метаболічні процеси в тварин у різні періоди онтогенезу».

**Вступ.** Хром ( $\text{Cr}^{3+}$ ) відноситься до життєво необхідних мікроелементів для людини і лабораторних тварин, а метаболічні ефекти його в організмі значною мірою залежать від форми і дози введення [12]. В літературі є дані про стимулюючий вплив хрому на активність антиоксидантної системи в печінці щурів [11]. Крім цього відомо, що хром у комплексі з цинком виявляє антиоксидантну дію в організмі людей з цукровим діабетом [5]. Проте, є й інші повідомлення, що хром як метал зі змінною валентністю може ініціювати пероксидні процеси в організмі тварин [9]. Подвійна дія  $\text{Cr}^{3+}$ , як антиоксиданта так і прооксиданта, може бути обґрунтована його здатністю приймати участь в окисно-відновних реакціях [12].

Відомо, що метаболічна відповідь клітини на дію певних чинників, зокрема хрому, залежить від її окисно-відновного стану, який через варіабельність рівня відновленості низькомолекулярних сполук і білків (тиоредоксину, глутатіону та ін.) та ефективності системи антиоксидантного захисту здатен впливати на формування адаптаційних реакцій. Актуальність вивчення цього питання зумовлена ключовим положенням глутатіонових ензимів у забезпеченні антиоксидантного захисту в організмі щурів. В цьому контексті заслуговує на увагу використання хрому у вигляді наноаквахелатів, які характеризуються високою біологічною активністю в організмі.

**Мета досліджень** – з'ясувати дію наносполуки хрому на стан глутатінової антипероксидної системи в крові та тканинах самців щурів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проводили на 12 самцях білих лабораторних щурів масою 180–200 г, згідно з вимогами етики, передбаченими положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Тварини перебували у віварії за відповідних умов освітлення, температурного режиму та стандартного раціону. Щурі були поділені на дві експериментальні групи – контрольну і дослідну, по 6 тварини у кожній. Самцям щурів дослідної групи, на відміну від контрольної, до

питної води додавали розчин цитрату нанохрому, з розрахунку 10 мкг  $\text{Cr}^{3+}$ /кг маси тіла. Розчин цитрату нанохрому був одержаний методом ерозійно вибухової нанотехнології [4]. Суть цього методу полягає в отриманні водного колоїдного розчину наночастинок хрому за допомогою електроімпульсної аквананотехнології, які після безпосередньої взаємодії з лимонною кислотою утворюють цитрат нанохрому.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

На 30 добу тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом. Матеріалом для досліджень були кров тварин та їх тканини: печінка, нирки, селезінка, легені, мозок, серце та скелетні м'язи. Досліджували вміст гідроперекисів ліпідів за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою з наступним внесенням у середовище тіоціанату амонію; вміст відновленого глутатіону визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс, 2-нітробензойною кислотою; активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) – за швидкістю окиснення відновленого глутатіону; активність глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) – за швидкістю відновлення глутатіону в присутності NADPH [1]. Вміст хрому у крові визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі СП-115ПК. Одержані експериментальні дані опрацьовували статистично за допомогою програми Microsoft EXCEL. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У результаті проведених досліджень встановлено, що за умови споживання щурами з водою цитрату нанохрому, в кількості 10 мкг  $\text{Cr}^{3+}$ /кг маси тіла, зростає вміст хрому в крові на 13,5%, з 0,56 мкг/л – у контрольній групі до 0,63 мкг/л – у дослідній. Збільшення вмісту хрому в крові тварин, очевидно обумовлює його вплив на фізіолого-біохімічні процеси в їх організмі. Так, за дії цитрату нанохрому у крові та тканинах щурів змінюється інтенсивність протікання

Таблиця 1

**Гідроперекиси ліпідів та показники глутатіонової системи в крові щурів за дії цитрату нанохрому в кількості 10 мкг Cr<sup>3+</sup>/кг (M±m, n=6)**

Показники крові	Контрольна група	Дослідна група
ГПЛ, ум. од/г протеїну	0,37±0,05	0,46±0,05
Відновлений глутатіону, мкмоль/л	0,43±0,03	0,25±0,03**
Глутатіон-пероксидаза, нмоль/хв на 1 мг протеїну	35,26±4,36	47,63±2,70*
Глутатіон-редуктаза, мкмоль/хв на 1 мг протеїну	0,79±0,13	1,00±0,12

**Примітка:** у цій і наступній таблицях \* - p<0,05; \*\* - p<0,01; \*\*\* -p<0,001.

процесів перекисного окиснення ліпідів та активність ензимів глутатіонової пулу.

У крові щурів дослідної групи (табл. 1) спостерігається тенденція до збільшення вмісту продуктів проміжної стадії перекисного окиснення ліпідів – гідроперекисів (ГПЛ). Вірогідне зростання ГПЛ в 2,3 раза спостерігається в селезінці тварин дослідної групи (табл. 2), що, очевидно, свідчить про стимулюючий

вплив наночастинок хрому в дозі 10 мкг/кг на перебіг процесів перекисного окиснення ліпідів у цій тканині. Проте, у печінці (в 1,8 раза) тварин дослідної групи, а також дещо у мозку та серці вміст ГПЛ знижується. В інших тканинах їх вміст за дії цитрату нанохрому не змінюється (табл. 2), що, очевидно, свідчить про певні органно-тканинні різниці у ступені впливу наночастинок хрому.

Глутатіонова антипероксидна система ефективно захищає клітини від оксидативного стресу, а при її недостатності або виснаженні виникають серйозні пошкодження. Зрозуміло, що з точки зору небезпеки розвитку цілого ряду захворювань, які можна об'єднати в групу вільнорадикальних патологій, потрібно прагнути уникати не тільки виснаження вмісту глутатіону, а всього пулу біоантиоксидантів, що функціонують у складі фізіологічної антиоксидантної системи організму.

Відновлений глутатіон (ВГ) – це найбільш важливий компонент глутатіонової пулу, який швидко мобілізується в разі підвищеного вмісту пероксидів та відновлює їх у реакції, що супроводжується утворенням окисненого глутатіону, який є токсичним для клітин. У крові щурів вміст ВГ за дії цитрату нанохрому зменшується в 1,7 раза (табл. 1). Очевидно, це зумовлене впливом наночастинок хрому, які стимулюють перекисне окиснення ліпідів в крові та впливають на індукцію цитохрому Р-450 і глутатіон-S-трансферази, що супроводжується зниженням рівня ВГ, який інтенсивно витрачається в якості агента кон'югації.

Таблиця 2

**Гідроперекиси ліпідів та показники глутатіонової системи в тканинах щурів за дії цитрату нанохрому в кількості 10 мкг Cr<sup>3+</sup>/кг (M±m, n=6)**

Тканина	Група	Гідроперекиси ліпідів, ум. од/г протеїну	Відновлений глутатіону, мкмоль/г	Глутатіон-пероксидаза, нмоль/хв на 1 мг протеїну	Глутатіон-редуктаза, мкмоль/хв на 1 мг протеїну
Печінка	К	0,35±0,03	0,21±0,02	9,841±0,620	0,536±0,028
	Д	0,19±0,01**	0,28±0,02*	13,696±1,357*	0,646±0,103
Нирки	К	0,32±0,04	0,26±0,04	9,091±1,163	0,512±0,065
	Д	0,32±0,07	0,31±0,02	9,738±0,297	1,333±0,319*
Селезінка	К	0,48±0,09	0,14±0,01	7,704±0,657	0,407±0,082
	Д	1,10±0,05**	0,19±0,01**	9,867±1,208	0,581±0,001
Легені	К	0,41±0,06	0,06±0,01	5,373±0,723	0,327±0,031
	Д	0,43±0,03	0,13±0,01**	8,060±1,079	0,460±0,039*
Мозок	К	0,29±0,06	0,09±0,02	7,40±1,09	0,465±0,084
	Д	0,22±0,02	0,13±0,01	18,18±2,66**	0,642±0,013
Серце	К	0,51±0,03	0,13±0,01	4,196±0,199	2,515±0,069
	Д	0,38±0,15	0,17±0,02	5,576±0,717	5,093±0,555*
М'язи	К	0,23±0,04	0,14±0,01	5,70±0,51	0,440±0,063
	Д	0,26±0,02	0,20±0,04	11,28±1,56**	1,552±0,195**

Крім цього, зниження вмісту ВГ в крові зумовлене, очевидно, посиленням використання його відновлювального агента, зменшенням швидкості відновлення, а також порушеннями в процесі його біосинтезу. В еритроцитах ВГ може інтенсивно використовуватися на підтримку нативного стану білків, а також у процесах видалення перекису водню і гідроперекисів органічних речовин за умов посилення перекисного окиснення ліпідів. Водночас швидкість його регенерації обмежена, оскільки відновні еквіваленти NADH/NADPH системи спрямовані на процеси відновлення тривалентного (фері-іона) заліза метгемоглобіну до двовалентного (феро-іона заліза) [3].

Слід вказати, що роль ВГ не обмежується формуванням основного низькомолекулярного антиоксидантного потенціалу еритроцитів, що дає змогу протистояти гемоглобін-ензимозалежній генерації активних форм кисню. Окрім цього, клітинний ВГ бере участь у підтримці пулу відновленого аскорбату – антиоксиданту, який захищає елементи крові зовні [2].

У той же час, вміст відновленого глутатіону у тканинах за дії цитрату нанохрому (**табл. 2**), на відміну від крові, вірогідно зростає у печінці (в 1,3 раза), селезінці (в 1,4 раза), легенях (в 2,2 раза) та дещо у нирках, мозку, серці та м'язах.

Очевидно, підвищення вмісту відновленого глутатіону у тканинах за дії хрому відбувається за рахунок активації синтезу вітаміну С з L-гулонолактону в печінці щурів, який, в свою чергу, захищає ВГ проти руйнування його  $H_2O_2$  [10]. Відомо, що печінка – головний орган синтезу ВГ у ссавців, який забезпечує близько 90% всього циркулюючого глутатіону при фізіологічних умовах [8]. Надходження глутатіону з печінки в плазму крові і жовч стимулюється деякими гормонами, зокрема глюкагоном і вазопресинном. Глутатіон крові утилізується тканинами організму шляхом транспорту через клітинні мембрани і ресинтезу всередині клітин шляхом глутамільного циклу. Надходження глутатіону з крові в тканини контролюється активністю  $\gamma$ -глутамілтранспептидази (ГГТ). Глутатіон входить до складу ГГТ і є акцептором у перенесенні амінокислот з міжклітинного простору до клітин. Після розпаду глутатіону на складові він може відновлюватися за рахунок 3 молекул АТФ та знову брати участь у транспорті амінокислот. В цих умовах, якщо немає значного навантаження, 80-90% глутатіону захоплюється нирками внаслідок надзвичайно високої активності в них ГГТ; в інших тканинах і органах (скелетні м'язи, серце) турновер глутатіону відбувається з малою швидкістю [7].

Стан глутатіонового пулу визначається взаємопов'язаним функціонуванням у глутатіоновому редокс-циклі ензимів глутатіонпероксидази (ГП) та глутатіонредуктази (ГР).

Ензимом, що відновлює  $H_2O_2$  до води, а органічні гідропероксида до гідросполук і перериває

ланцюгові реакції внутрішньоклітинного переокиснення, є глутатіонпероксидаза. Активність ГП в крові тварин дослідної групи зростає в 1,3 раза порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 1). Крім цього, за дії цитрату нанохрому виявлено вірогідне підвищення активності ГП у печінці (в 1,4 раза), мозку (в 2,4 раза), м'язах (в 2,0 раза) та незначне в селезінці, легенях і серці щурів (**табл. 2**).

Проте тривала активація ензиму у тканинах щурів можлива лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного ВГ, який виконує роль не лише субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, що окиснюються у процесі глутатіонпероксидазної реакції. У крові підвищення активності ГП відбувається на тлі зменшення вмісту ВГ, що, очевидно, зумовлене вичерпанням його пулу, завдяки інтенсивному використанню глутатіонпероксидазою і, можливо, глутатіонтрансферазою.

Підтримання фізіологічного рівня відновленого глутатіону в клітинах забезпечується функціонуванням глутатіонредуктази (ГР), активність якої вірогідно зростає в нирках (в 2,6 раза), легенях (в 1,4 раза), серці (в 2,0 раза), м'язах (в 3,5 раза) та дещо в печінці, селезінці, мозку та крові тварин дослідної групи (**табл. 1, 2**). Каталітична активність глутатіонредуктази детермінується наявністю NADPH – одного з продуктів дегідрогеназних реакцій. Таким чином, реалізується метаболічний зв'язок між пентозофосфатним шунтом та функціональною здатністю антиоксидантної системи в клітинах. Крім цього відомо, що зростання активності ензимів антиоксидантного захисту в тканинах щурів за дії хрому може бути обумовлено стимуляцією експресії генів, які кодують їх синтез [6].

Отже, узгоджена дія всіх компонентів глутатіонової системи сприяє встановленню оптимального рівня пероксидних сполук і збереженню антиоксидантного гомеостазу в організмі самців щурів за дії цитрату нанохрому.

**Висновки.** Споживання щурами з питною водою цитрату нанохрому, в кількості 10 мкг  $Cr^{3+}$ /кг маси тіла, супроводжується збільшенням вмісту гідроперекисів ліпідів та зниженням вмісту відновленого глутатіону в крові, що свідчить про незначне посилення прооксидантних процесів. У тканинах щурів за дії цитрату нанохрому зростає вміст відновленого глутатіону та активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази, що свідчить про антиоксидантний ефект хрому в досліджуваних тканинах. Отримані результати вказують на значні органно-тканинні різниці у ступені впливу наночастинок хрому на стан глутатіонової антипероксидної система в організмі щурів.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні впливу наночастинок хрому в кількостях 2-5 мкг  $Cr^{3+}$ /кг маси тіла на активність антиоксидантного та імунного статусу організму щурів.

**Список літератури**

1. Довідник: Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / Влізло В.В., Федорук Р.С., Макар І.А. [та ін.]. — Львів: видавництво «ВМС», 2004. — 399 с.
2. Ефимов А. С. Некоторые итоги и перспективы развития диабетологии / А. С. Ефимов, Е. В. Плешанов // Пробл. эндокринологии. — 1988. — Т.34, №2. — С.13–15.
3. Кулинский В. И. Биологическая роль глутатиона / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Успехи соврем.биол. — 1990. — Т.110, вып. 1/4. — С. 20–33.
4. Патент 29856 UA. МПК (2006): B01J 13/00, B82B 3/00. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів «Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів нанометалів» / Косінов М. В., Каплуненко В. Г. — Опубл. 25.01.2008; Бюл. № 2/2008.
5. Anderson R. A. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus / R.A. Anderson, A. M. Roussel, N. S. Zouari [et al] // J. Am. College Nutr. — 2001. — V. 20. — P. 212–218.
6. Chen W. Y. Chromium attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis / W. Y. Chen, C. J. Chen, J. W. Liao [et al] // Life Sciences. — 2009 — Vol.84. — P. 606–614.
7. Deleve L. D. Importance and regulation of hepatic glutathione / L. D. Deleve, N. Kaplowitz // Sem. Liv. Dis. — 1990 — Vol.10, N4. — P. 251–266.
8. Deneke S. M. Regulation of cellular glutathione / S. M. Deneke, B. Y. Fanburg // Amer. J. Physiol. — 1989. — Vol.257. — P. 163–173.
9. Lushchak O. V. Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain / O. V. Lushchak, O. I. Kubrak, I. M. Torous [et al] // Chemosphere. — 2009. — V.75 — P. 56–62.
10. Sahin K. Effects of chromium and ascorbic acid supplementation on growth, carcass traits, serum metabolites and antioxidant status of broiler chickens reared at a high ambient temperature / K. Sahin, N. Sahin, O. Kucuka // Nutr. Res. — 2003. — Vol. 23. — P. 225–238.
11. Ueno S. Effects of chromium in lipid peroxydation in isolated hepatocytes / S. Ueno, N. Susa, Y. Furukawa [et al] // Jpn J. Sci. — 1998. — V.50. — P.45–52.
12. Vincent J.B. The Nutritional Biochemistry of Chromium (III) / Vincent J.B. — Department of Chemistry The University of Alabama Tuscaloosa, USA, 2007.— 277 p.

УДК 614.449:678.048

**ГЛУТАТИОНОВА АНТИПЕРОКСИДНА СИСТЕМА В КРОВІ ТА ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА ДІЇ ЦИТРАТУ НАНОХРОМУ**

**Искра Р.Я., Сварчевська О.З., Максимович І.Я.**

**Резюме.** Досліджували вплив цитрату нанохрому в дозі 10 мкг Cr<sup>3+</sup>/кг маси тіла на активність глутатионової антипероксидної системи в крові та тканинах щурів. У крові тварин за дії цитрату нанохрому встановлено збільшення вмісту гідроперексидів ліпідів та зменшення відновленого глутатиону. У тканинах щурів дослідної групи зростає вміст відновленого глутатиону та активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази.

**Ключові слова:** щурі, цитрат нанохрому, глутатіон, антиоксидантна система.

УДК 614.449:678.048

**ГЛУТАТИОНОВАЯ АНТИПЕРОКСИДНАЯ СИСТЕМА В КРОВИ И ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИТРАТА НАНОХРОМА**

**Искра Р.Я., Сварчевская О.З., Максимович И.Я.**

**Резюме.** Исследовали влияние цитрата нанохрома в дозе 10 мкг Cr<sup>3+</sup>/ кг массы тела на активность глутатионової антипероксидної системи в крові и тканях крыс. В крови животных при действии цитрата нанохрома установлено увеличение содержания гидроперексидов липидов и уменьшение восстановленного глутатиона. В тканях крыс опытной группы возрастает содержание восстановленного глутатиона и активность глутатіонпероксидазы и глутатіонредуктазы.

**Ключевые слова:** крысы, цитрат нанохрома, глутатіон, антиоксидантная система.

UDC 614.449:678.048

**Antiperoxide Glutathione System In Blood And Tissues Of Rats Under The Action Of Citrate Nanochromium**

**Iskra R.Ja., Svarchevska O.Z., Maksimovich I.Ja.**

**Summary.** The effect of citrate nanochromium in dose of 10 μg Cr<sup>3+</sup> / kg body weight on antiperoxide glutathione system in the blood and tissues of rats was studied. In the blood of animals after citrate nanochromium found increased content of hydroperoxides lipids and decrease of reduced glutathione. In rat tissues research group growth content of reduced glutathione and glutathione peroxidase activity and glutathione reductase.

**Key words:** rats, citrate nanochromium, glutathione, antioxidant system.

Стаття надійшла 21.04.2012 р.

Рецензент – проф. Дубінін С.І.