

БІОХІМІЯ

УДК 546.76:599.323.4

**ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ
І ВУГЛЕВОДНИЙ ОБМІН У КРОВІ ЩУРІВ ЗА ДІЇ НЕОРГАНІЧНОЇ
ТА ОРГАНІЧНОЇ СПОЛУК ХРОМУ**

Р. Іскра

*Інститут біології тварин НААН
вул. В.Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: ruslana_iskra@inenbiol.com.ua*

Встановлено зниження показників перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – гідропероксидів, ТБК-активних продуктів і підвищення активності ферментів антиоксидантної системи (АОС) – глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, каталази і супероксиддисмутази в крові щурів за впливу хлориду хрому ($\text{CrCl}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) та наноаквацитрату хрому ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CrO}_7$). Відзначено, що при дії наночастинок цитрату хрому в крові щурів АОС функціонує більш інтенсивно, ніж при дії хлориду хрому. При дії наноаквацитрату хрому в крові тварин знижується вміст глюкози і підвищується активність гексокінази та лактатдегідрогенази.

Ключові слова: щури, хром, наносполука, антиоксидантна система, вуглеводний обмін.

Хром – мікроелемент, який поширений у природі переважно у двох формах – тривалентній (III) і шестивалентній (VI). Хром (VI) у вільному стані трапляється рідко і є надзвичайно токсичним для живих організмів, стимулює окислювальний стрес, пошкодження ДНК, апоптоз клітин і модифіковану експресію генів [11]. Хром (III) в окисленому стані є найбільш стабільною формою, він входить до складу живих організмів і є безпечним [19]. Цей мікроелемент підтримує нормальну функцію інсуліну, сприяє транспорту глюкози з крові в клітини печінки, м'язів і жирової тканини [19]. Численні дослідження показали, що хром корисний при лікуванні інсулінорезистентності й цукрового діабету у людей [12]. Крім цього, він є одним із активних гіпохолестеринемічних мікроелементів [15].

Відомо, що добавки хрому використовують у вигляді неорганічних сполук (в основному це хлорид хрому) та органічних (нікотинат хрому, піколінат хрому, цитрат хрому, ацетат хрому), а також у вигляді хромовмісних дріжджів. Проте неорганічні сполуки хрому мають нижчий рівень засвоєння цього елемента в організмі, порівняно з органічними сполуками [19].

Було вивчено ефект різних концентрацій 0, 500, 1000, 1500 мкг Cr(III) /кг у вигляді органічної (нікотинат хрому) і неорганічної (хлорид хрому) сполук на якість м'яса бройлерів за умов теплового стресу. Встановлено зменшення інтенсивності процесів ПОЛ у м'язах бройлерів при згодовуванні обох сполук хрому, особливо органічної [17].

Використання органічних сполук у вигляді наночастинок, у яких наявність мікроелементів зведена до мінімуму зі збереженням їхньої високої біологічної активності, є перспективним науковим напрямом у нанобіотехнології. Так, було встановлено, що при додаванні хрому в дозах 75, 150, 300, 450, 600 мкг/кг у вигляді наночастинок збільшилися середньодобові прирости щурів, кількість спожитої їжі та підвищилася концентрація хрому в окремих тканинах, залежно від дози [20]. Тому метою даної роботи було порівняльне

вивчення біологічної дії хлориду хрому та наноаквацитрату хрому на інтенсивність процесів ПОЛ, активність антиоксидантних ферментів і ферментів вуглеводного обміну в крові щурів.

Матеріали та методи

Для проведення досліджень було підбрано 3 групи білих лабораторних щурів самців лінії Вістар, яким згодовували стандартний комбікорм для щурів. Тваринам контрольної групи випоювали дистильовану воду, без вмісту хрому. Дослідні групи щурів отримували хром, розчинений у воді, в дозах: 1 дослідна – 200 мкг Cr(III) /л, у вигляді $\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 2 дослідна – 50 мкг Cr(III) /л у вигляді наноаквахелатного розчину цитрату хрому ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CrO}_7$), отриманого за методом Каплуненка-Косінова [8]. Матеріалом для дослідження була кров щурів, яку отримували після 30-денного випоювання розчинів хрому.

У крові визначали вміст гідропероксидів за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою (ТХО) з подальшим внесенням у середовище тіоціанату амонію [1]. Концентрацію ТБК-активних продуктів вимірювали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою [4]. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.1.15.1.) визначали за методом, принцип якого полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами [3]. Активність глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону [7]. Активність каталази (КТ, КФ 1.11.1.6) визначали за допомогою здатності пероксиду водню утворювати зі солями молібдену стійкий кольоровий комплекс [5]. Активність глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) визначали за швидкістю відновлення глутатіону в присутності NADPH [2]. Вміст відновленого глутатіону визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс, 2-нітробензойною кислотою [2]. Активність вуглеводних ферментів (гексокінази (ГК, КФ 2.7.1.1), лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49)) визначали за допомогою спектрофотометричного методу, що базується на використанні спряжених систем окиснення або відновлення нікотинамідних коферментів [9]. Вміст глюкози визначали глюкозооксидазним методом, який ґрунтується на дії глюкозооксидази, котра забезпечує окиснення глюкози киснем повітря до глюкуронової кислоти [2]. Одержані цифрові дані опрацьовували статистично за допомогою програми Microsoft EXCEL. Для визначення вірогідних різниць між середніми значеннями використовували критерій Стьюдента.

Результати і їхнє обговорення

Проведені дослідження показали, що випоювання дослідним щурам сполук хрому призводить до вірогідного зниження вмісту продуктів ПОЛ – гідропероксидів у плазмі крові щурів першої (в 1,6 разу) і другої (в 1,7 разу) дослідних груп ($P < 0,01$), порівняно з їх концентрацією в плазмі крові контрольної групи, що, очевидно, свідчить про прискорену деградацію пероксидів (табл. 1). У той час вміст вторинних продуктів ПОЛ – ТБК-активних продуктів перекисного окиснення ліпідів вірогідно знижується (в 1,3 разу) лише у крові тварин першої дослідної групи ($P < 0,05$). Отримані результати свідчать про інгібувальний вплив хрому на утворення продуктів ПОЛ і посилення їхньої деградації при збільшенні споживання щурами хрому, що узгоджується з даними літератури [18]. Крім того, відомо, що добавки Cr(III) курчатам-бройлерам при тепловому стресі приводять до збільшення концентрації в сироватці крові вітамінів С та Е і зниження ТБК-активних продуктів [16].

АОС є провідною і найбільш потужною в механізмі захисних процесів, оскільки вона запобігає не тільки розвиткові вільнорадикальних реакцій, накопиченню супероксид-

аніона та пероксидів, але й опосередковано підтримує високу активність окисно-відновних процесів, забезпечує елімінацію кінцевих кисневих метаболітів із залученням їх до енергетичного обміну і процесів синтезу.

У дослідженнях встановлено, що за дії сполук хрому підвищується активність ферментів АОС і концентрація відновленого глутатіону в крові тварин. Проте у крові щурів першої дослідної групи при додаванні неорганічної форми хлориду хрому спостерігаємо зростання активності СОД в 1,4 разу ($P < 0,01$) і тенденцію до зростання активності ГП, ГР та вмісту відновленого глутатіону, порівняно з активністю відповідних ферментів у крові тварин контрольної групи. Водночас у крові тварин другої дослідної групи при додаванні органічної сполуки наноаквацитрату хрому спостерігаємо вірогідне зростання активності усіх досліджуваних ферментів АОС – ГП, NADPH- залежної ГР, КТ та СОД ($P < 0,025-0,002$), порівняно зі значеннями цих показників у крові щурів контрольної групи. За тих же умов вміст відновленого глутатіону вірогідно не різнився у дослідній і контрольній групі, що потребує подальших досліджень. Відомо, що активація ГП можлива лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного відновленого глутатіону, який виконує роль не лише субстрату реакцій, але й фактора, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, які окиснюються у процесі глутатіонпероксидазної реакції [6]. У той же час підтримання фізіологічного рівня відновленої форми трипептиду в клітинах забезпечується функціонуванням ГР, каталітична активність якої детермінується наявністю NADPH – одного з продуктів дегідрогеназних реакцій. Таким чином, реалізується метаболічний зв'язок між енергетичними процесами та функціональною здатністю антиоксидантної системи у клітинах.

Загалом, отримані результати свідчать про стимулювальний вплив хрому на активність функціонування АОС. А вплив органічної наноформи хрому на активність антиоксидантних ферментів в еритроцитах крові щурів виражений більшою мірою, ніж неорганічної форми. Антиоксидантна дія Cr(III) може бути зумовлена його здатністю брати участь в окисно-відновних реакціях [19]. У результаті дії хрому, ймовірно, відбувається зростання експресії генів і збільшення активності ферментів антиоксидантного захисту, а отже, і зниження рівня продуктів ПОЛ. Отримані результати узгоджуються з даними літератури, у яких гепатопротекторну дію хрому пов'язують із його антиоксидантними властивостями при хронічному холестази щурів [13]. Крім цього, відомо, що добавки хрому людям з гіперглікемією в дозі 1000 мкг Cr(III)/добу у вигляді дріжджів мінімізували збільшення окисного стресу [12]. Також встановлено, що хром у комплексі з цинком зумовлював позитивний антиоксидантний ефект на негативні наслідки окисного стресу у людей із цукровим діабетом [10].

У результаті проведених досліджень виявлено вірогідне зниження рівня глюкози в плазмі крові щурів за дії хлориду хрому (1,9 разу) та наноаквацитрату хрому (в 1,5 разу) (табл. 2). Цей вплив хрому пов'язують з потенціюючим впливом хрому на дію інсуліну в організмі тварин, в основі якої лежить участь хрому в синтезі хромодуліну – специфічного білка, який використовується в активації рецепторів інсуліну [19]. Глюкоза, проникаючи в клітини, метаболізується по шляху гліколізу. Про це свідчить вірогідне зростання в еритроцитах крові тварин другої дослідної групи активності ГК ($P < 0,001$) та ЛДГ ($P < 0,05$) порівняно з їхньою активністю у крові тварин контрольної групи. Підвищення активності ферментів гліколізу, очевидно, зумовлене стимулювальним впливом хрому на експресію генів ферментів в еритроцитах крові щурів.

У той же час активність NADPH-генерувального ферменту – Г-6-ФДГ не змінюється на фоні зростаючої активності ГР у крові тварин другої дослідної групи. Очевидно, що під-

Таблиця 1

Вміст продуктів ПОЛ у плазмі крові щурів і активність антиоксидантних ферментів у гемолізатах еритроцитів щурів ($M \pm m$, $n=5$)

	Групи тварин		
	контрольна	1 дослідна	2 дослідна
Гідроперекиси ліпідів, ум. од/г протеїну	0,68±0,053	0,42±0,012**	0,39±0,01**
ТБК-активні продукти, нмоль МДА/ г протеїну	5,49±0,16	4,32±0,34*	5,34±0,22
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв на 1 мг протеїну	19,63±1,06	23,51±1,28	25,17±0,55**
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв на 1 мг протеїну	0,421±0,020	0,431±0,041	0,633±0,024**
Каталаза, мкмоль/хв на 1 мг протеїну	5,093±0,345	4,160±0,153	6,933±0,305*
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,140±0,016	0,157±0,005	0,125±0,002
Супероксиддисмутаза, ум. од./мг протеїну	6,59±0,31	9,30±0,39**	10,10±0,33***

Примітка. У табл. 1 і 2 вірогідні різниці показників щурів дослідних груп, порівняно з контрольною: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

тримання глутатіонового редокс-циклу у крові тварин другої дослідної групи відбувається за участю іншого ферменту, можливо, ізоцитратдегідрогенази (NADP-ЩЦДГ). Таку взаємодію висвітлено у роботах інших авторів, зокрема, при ішемічному ушкодженні міокарда щурів [14]. Таким чином, можна припустити, що синтез NADPH у NADP-ЩЦДГ реакціях може бути альтернативним джерелом відновних еквівалентів у разі низької активності ферментів пентозофосфатного шляху.

Таблиця 2

Показники вуглеводного обміну в крові щурів за дії сполук хрому ($M \pm m$, $n=3$)

Кров	Групи тварин		
	контрольна	1 дослідна	2 дослідна
Глюкоза, ммоль/л	8,90±0,28	4,69±0,25***	5,77±0,27***
Гексокінази, мкмоль NADPH /хв х мг протеїну	0,0545±0,0018	0,06207±0,0025	0,0837±0,0009***
Лактатдегідрогеназа, мкмоль NAD /хв х мг протеїну	4,565±0,174	3,626±0,189	5,087±0,040*
Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, мкмоль NADPH/хв х мг протеїну	0,605±0,006	0,682±0,036	0,582±0,021

Таким чином, хром у вигляді хлориду й наноаквацитрату впливає на активацію АОС, вуглеводний обмін і пригнічує ПОЛ у крові щурів дослідних груп. Проте слід відзначити, що при дії наноаквацитрату хрому, незважаючи на чотирикратну різницю його концентрації, порівняно з хлоридом хрому, в крові щурів інтенсивніше впливає на активність АОС і вуглеводний обмін. Це свідчить про те, що наноаквацитрат хрому, незважаючи на невеликі концентрації, має кращу здатність всмоктуватися в організмі та вищу біологічну активність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. А.с. № 1084681 СССР, МКИ G № 33/48. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях /Мирончик В. В. (СССР). № 3468369/2813; заявл. 08.07.82; опубл. 07.04.84, бюл. № 13.
2. Влізло В. В., Федорук Р. С., Макар І. А. та ін. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: Довідник. Львів: ВМС, 2004. 399 с.
3. 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.
4. Коробейникова Э. Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // Лаб. дело. 1989. № 7. С. 8–10.
5. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–18.
6. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы // Усп. совр. биол. 1993. Т. 113. С. 107–121.
7. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 724–727.
8. Патент України на корисну модель № 29856. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів «Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів нанометалів» // Косінов М. В., Каплуненко В. Г. / МПК (2006): B01J 13/00, B82B 3/00. Опубл. 25.01.2008, бюл. № 2/2008.
9. Снитинский В. В., Янович В. Г. Исследование углеводно-энергетического обмена у сельскохозяйственных животных: Метод. рекомендации. Львов, 1984. 28 с.
10. Anderson R. A., Roussel A. M., Zouari N. S. et al. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus // J. Am. College Nutr. 2001. Vol. 20. P. 212–218.
11. Bagchi D., Stohs S. J., Downs B. W. et al. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium // Toxicol. 2002. Vol. 180(1). P. 5–22.
12. Cheng H. H., Lai M. H., Hou W. C., Huang C. L. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52(5). P. 1385–1393.
13. Chen W. Yi., Chen C. Ju., Liao J. W., Mao F. C. Chromium attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis // Life Sci. 2009. Vol. 84. P. 606–614.
14. Gromek A., Pastuzko A. The localization of mitochondrial nadp-dependent isocitrate dehydrogenase in normal and hypoxic conditions // J. Neurochem. 1977. Vol. 28. P. 429–433.
15. Rajpathak S., Rimm E. B., Li T. et al. **Lower toenail chromium in men with diabetes and cardiovascular disease compared with healthy men** // Diabetes Care. 2004. Vol. 27. P. 2211–2216.
16. Sahin K., Sahin N., Kucuka O. 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 // Nutr. Res. 2003. Vol. 23. P. 225–238.
17. Toghyani M., Khodami A., Gheisari A. A. Effect of Organic and Inorganic Chromium Supplementation on Meat Quality of Heat-Stressed Broiler Chicks // Am. J. Animal and Veterinary Sci. 2008. Vol. 3 (2). P. 62–67.
18. Ueno S, Susa N, Furukawa Y. et al. Effects of chromium in lipid peroxydation in isolated hepatocytes // Jpn. J. Sci. 1998. Vol. 50. P. 45–52.
19. Vincent J. B. The Nutritional Biochemistry of Chromium (III). Department of Chemistry The University of Alabama Tuscaloosa, USA, 2007. 277 p.
20. Zha L. Y., Xu Z. R., Wang M. Q., Gu L. Y. Effects of chromium nanoparticle dosage on growth,

body composition, serum hormones and tissue chromium in Sprague-Dawley rats // J. Zheji-ang Univ. Sci. B. 2007. Vol. 8(5). P. 323–330.

Стаття: надійшла до редакції 12.04.11

доопрацьована 24.05.11

прийнята до друку 02.06.11

FUNCTIONAL CONTENT OF ANTIOXIDANT SYSTEM AND CARBOHYDRATE METABOLISM OF RATS BLOOD UNDER ACTIONS OF INORGANIC AND ORGANIC CHROMIUM COMPOUNDS

R. Iskra

*Institute of Animal Biology NAAS
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: ruslana_iskra@inenbiol.com.ua*

The influence of chromium compound inorganic ($\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) and of chromium citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CrO}_7$) in nanoaquachelate form on decrease of lipid peroxidation processes indices, hydroperoxides and TBK-active products and increase of activity of the antioxidant system enzymes (AOS) glutathioneperoxidase, glutathionereductase, catalase and superoroxidisedismutase in blood of rats was established. It is marked, that at the action of nanoparticles of chromium citrate in blood of rats functions more intensively AOS, in comparison to its activity at the action of chromium chloride. At the action of chromium chloride and organic nanocompounds of chromium content of glucose goes down and rises activity of hexokinase and lactatedehydrogenase.

Key words: rat, chromium, nanocompound, antioxidant system, carbohydrate metabolism.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН В КРОВИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕОРГАНИЧЕСКОГО И ОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЙ ХРОМА

Р. Искра

*Институт биологии животных НААН
ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина
e-mail: ruslana_iskra@inenbiol.com.ua*

Установлено влияние хлорида хрома ($\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) и наносоединения цитрата хрома ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CrO}_7$) на снижение показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) – гидроперекисей, БТК-активных продуктов и повышение активности ферментов антиоксидантной системы (АОС) – глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, каталазы и супероксиддисмутазы в крови крыс. Отмечается, что при действии наночастиц цитрата хрома в крови крыс АОС функционирует более интенсивно, чем при действии хлорида хрома. При действии органического наносоединения хрома в крови животных снижается содержание глюкозы и повышается активность гексокиназы и лактатдегидрогеназы.

Ключевые слова: крысы, хром, наносоединения, антиоксидантная система, углеводный обмен.