

**Біохімія**

УДК 577.121.2:599.323.4

**ВПЛИВ КАТІОНІВ КАДМІО НА ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ  
ЛІПІДІВ І АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ  
В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВІ ТВАРИН**

**Г. Антоняк\*, Л. Білецька\*\***

*\*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Дорошенка, 41, Львів 79000, Україна*

*\*\*Львівський національний аграрний університет  
вул. В. Великого, 1, Дубляни-Львів 80381, Україна*

У статті представлено результати досліджень впливу катіонів кадмію (за умов тривалого введення в формі  $CdCl_2$ ) на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів і стан антиоксидантної системи в лейкоцитах білих щурів. Встановлено, що під впливом катіонів кадмію в лімфоцитах і нейтрофільних гранулоцитах тварин істотно збільшується концентрація кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Упродовж експериментального періоду активність ферментів антиоксидантної системи в лейкоцитах піддослідних тварин змінюється неоднозначно, а саме: каталазна активність зменшується, а глутатіонпероксидазна – зростає.

*Ключові слова:* важкі метали, кадмій, лейкоцити, лімфоцити, нейтрофільні гранулоцити, антиоксидантна система.

Техногенне забруднення навколишнього середовища важкими металами є важливою екологічною проблемою сьогодення. Особливу небезпеку для здоров'я людей і тварин становить забруднення довкілля кадмієм, який характеризується високим рівнем токсичності та має високу здатність до акумуляції в організмі [14–16]. Відомо, що цей елемент здатний інгібувати функціональну активність білків, інактивуючи сульфгідрильні групи в їхніх молекулах. У механізмах токсичної дії кадмію істотну роль відіграє стимуляція процесів утворення активних форм кисню (АФК) (супероксидний і гідроксильний радикали, пероксид водню та ін.). Останні, завдяки своїй високій реакційній активності, стимулюють процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), спричиняють оксидативні пошкодження білків та інших біомолекул [9, 16, 18]. За таких умов важливе значення має антиоксидантна система як одна з функціональних ланок у механізмах захисту клітин від оксидативного стресу.

Активність процесів ПОЛ під впливом сполук кадмію виявляють у клітинах низки органів і тканин (гепатоцити, клітини мозку, статеві клітини, еритроцити) тварин і людини [1, 10, 16]. Що стосується клітин системи лейкопоезу, то глибина прооксидантного впливу на них катіонів важкого металу та механізми антиоксидантної відповіді лейкоцитів різних популяцій на дію  $Cd^{2+}$  майже не з'ясовані. Проте ця проблема є актуальною з огляду на важливу роль лейкоцитів у підтриманні імунного статусу організму [8, 12]. Як відомо, порушення балансу між вмістом прооксидантів і антиоксидантів у цих клітинах може призводити до пригнічення реакцій клітинного та гуморального імунітету [5, 7, 11].

Тому метою роботи було дослідити вплив  $Cd^{2+}$  (за умов тривалого надходження до організму в формі хлориду кадмію) на процеси ПОЛ і активність ферментів антиоксидантної системи в лейкоцитах крові білих щурів.

Дослідження проводили на безпородних білих лабораторних щурах-самцях масою 160–180 г, яких утримували в умовах віварію. Отруєння тварин катіонами кадмію викликали шляхом щодобового внутрішлункового введення хлориду кадмію в дозі 3 мг/кг маси впродовж 14 діб.

У процесі експерименту було сформовано три групи тварин: дві дослідні (Д1, Д2) і контрольна (К), по 5 щурів у кожній. Щури групи Д1 отримували хлорид кадмію в зазначеній концентрації впродовж семи діб, групи Д2 – впродовж чотирнадцяти діб. Щури контрольної групи отримували фізіологічний розчин за такою самою схемою.

Матеріалом досліджень була периферична кров, яку отримували декапітацією тварин груп Д1 і Д2, відповідно, на 7-му і 14-ту доби після початку введення  $\text{CdCl}_2$  і щурів контрольної групи. Для отримання лейкоцитів до гепаринізованої крові додавали желатин та інкубували при  $37^\circ\text{C}$ . Після осідання еритроцитів проводили фракціонування лейкоцитів [6]. Для фракціонування клітин застосовували градієнт густини фіколу та верографіну. Фракція клітин, що розміщувалася між плазмою і шаром суміші з питомою густиною  $1,077 \text{ г/см}^3$ , була збагачена лімфоцитами, фракція клітин між шарами суміші з питомою густиною  $1,077$  і  $1,119 \text{ г/см}^3$  – гранулоцитами. Цілісність і життєздатність клітин контролювали під мікроскопом і за допомогою реакції з трипановим синім [13].

У лізатах, приготованих шляхом трикратного заморожування–відтавання водних суспензій клітин із подальшим центрифугуванням, визначали вміст продуктів, що взаємодіють з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) і активність ферментів антиоксидантної системи (каталаза, глутатіонпероксидаза). Концентрацію ТБК-позитивних продуктів визначали методом [3]. Активність каталази досліджували за допомогою стандартної методики, використовуючи пероксид водню як субстрат реакції [4], глутатіонпероксидази – за швидкістю окиснення глутатіону за присутності гідропероксиду третинного бутилу [2]. Вміст білка в лізатах визначали за методом Лоурі та співавторів (1951). Отримані результати опрацьовували статистично з використанням методів варіаційної статистики.

Дослідження показали, що внаслідок тривалого надходження до організму хлориду кадмію активується процес пероксидного окиснення ліпідів у лейкоцитах периферичної крові піддослідних тварин. Про це свідчить істотне підвищення вмісту кінцевих продуктів ПОЛ і в лімфоцитах, і в нейтрофільних гранулоцитах крові щурів груп Д1 і Д2 порівняно з контрольною групою (рис. 1). Особливо виразні зміни концентрації ТБК-позитивних продуктів встановлено на сьому добу експерименту (група Д1). Необхідно зазначити, що на цій стадії досліджень різниця у значенні показника порівняно з контролем проявляється більшою мірою в нейтрофільних гранулоцитах, ніж у лімфоцитах щурів (у зазначених фракціях клітин зростає, відповідно, в 2,7 і 1,3 рази порівняно з контролем).

Як видно з представлених результатів, на наступній стадії експерименту (щури групи Д2) концентрація ТБК-позитивних продуктів ПОЛ у нейтрофільних гранулоцитах значно зменшується порівняно з їх концентрацією в нейтрофільних гранулоцитах тварин групи Д1, але ймовірно перевищує рівень, притаманний клітинам щурів контрольної групи (рис. 1). Водночас у лімфоцитах щурів, яким вводили кадмію впродовж 14-ти діб, їх вміст досягає майже такого ж самого рівня, як і у тварин групи Д1.

З аналізу динаміки вмісту кінцевих продуктів процесів ПОЛ у досліджуваних фракціях лейкоцитів щурів випливає, що масштаби викликаного кадмієм окислатив-

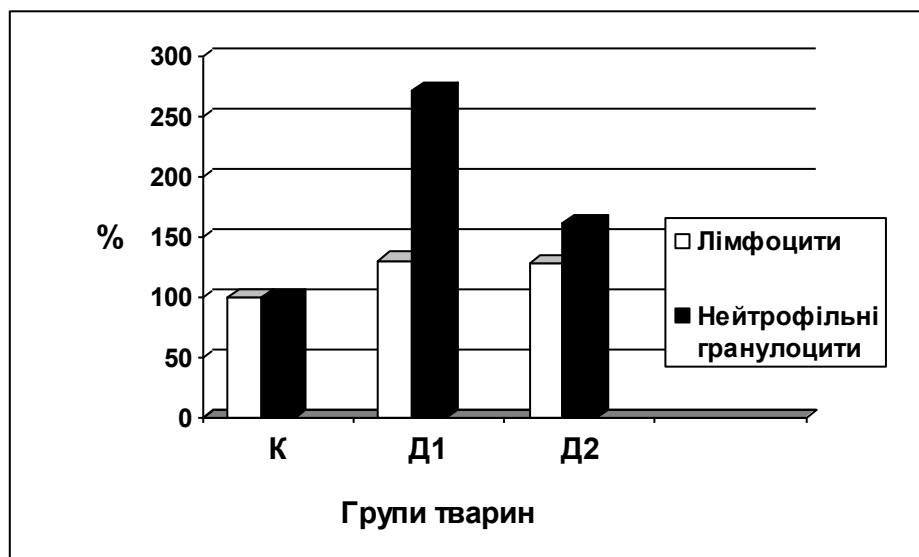


Рис. 1. Концентрація ТБК-позитивних продуктів ПОЛ у лімфоцитах і нейтрофільних гранулоцитах щурів, отруєних хлоридом кадмію.

ного стресу неоднакові у двох різних за походженням і функціями ліній клітин. Так, більша, ніж у лімфоцитах, амплітуда зростання концентрації ТБК-позитивних продуктів у нейтрофільних гранулоцитах може зумовлюватися більшою чутливістю цих клітин до впливу прооксидантів, які стимулюють процеси утворення активних форм кисню в клітинних структурах. Відомо, що активність специфічної NADPH-оксидази, яка каталізує процес утворення супероксидного радикала – ініціатора процесів ПОЛ – у мембранах нейтрофільних гранулоцитів значно більша, ніж в інших клітинах [14, 18]. Ймовірно, така особливість метаболізму може зумовлювати більшу інтенсивність процесів ПОЛ у нейтрофільних гранулоцитах порівняно з лімфоцитами тварин.

Водночас відомо, що інтенсифікація процесів ПОЛ у клітинах викликає низку таких шкідливих ефектів, як оксидативне пошкодження мембран, пригнічення каталітичної активності ферментів тощо [10, 19]. Тому в механізмах захисту клітин від оксидативного стресу важливе значення має активація антиоксидантної системи, встановлена в дослідженнях впливу на організм різних стресових чинників, зокрема катіонів важких металів [19].

Із результатів досліджень випливає, що активність ферментів-антиоксидантів (глутатіонпероксидаза, каталаза) у лейкоцитах різних клітинних ліній змінюється неоднозначно. Зокрема, глутатіонпероксидазна активність у лімфоцитах щурів групи Д1 не відрізняється від контрольних значень, але істотно зростає у тварин групи Д2 впродовж 14 діб після початку введення  $CdCl_2$  ( $p < 0,001$ ) (рис. 2). Водночас у нейтрофільних гранулоцитах цей показник досягає максимального значення у тварин групи Д1, збільшуючись утричі порівняно з контролем ( $p < 0,001$ ). На дальшій стадії експерименту активність глутатіонпероксидази в цих клітинах зменшується, хоча й залишається на вищому рівні, ніж у щурів контрольної групи ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

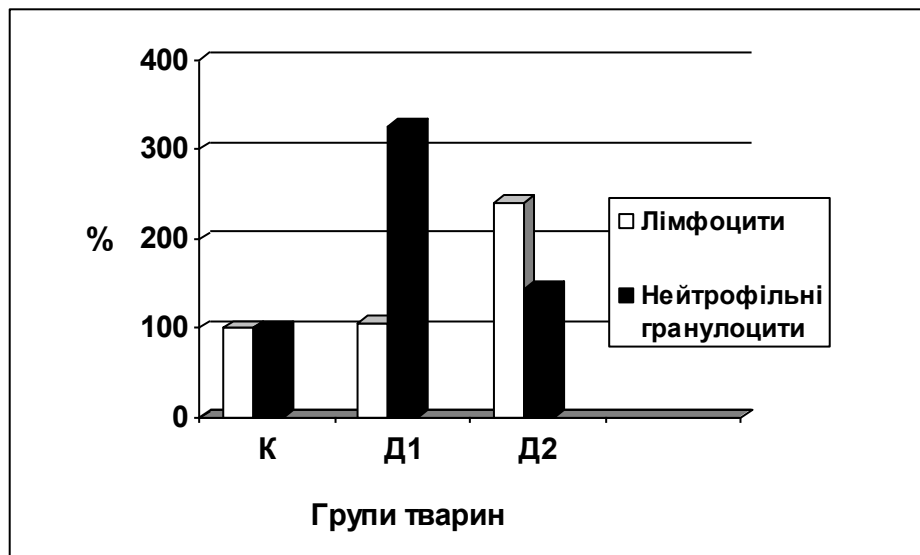


Рис. 2. Активність глутатіонпероксидази в лейкоцитах щурів, отруєних хлоридом кадмію.

Привертає увагу те, що в лейкоцитах тварин піддослідної групи динаміка глутатіонпероксидазної активності нагадує динаміку вмісту кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів, які взаємодіють з ТБК і, як відомо, віддзеркалюють зміни інтенсивності процесу ПОЛ у клітинах. Особливо виразно ця закономірність простежується в нейтрофільних гранулоцитах (рис. 2). Такий ефект може зумовлюватись активацією адаптаційного синтезу ферменту-антиоксиданта у відповідь на інтенсифікацію оксидативних процесів у лейкоцитах під впливом катіонів важкого металу [18, 19].

Що стосується каталазної активності в лейкоцитах, то цей показник характеризується специфічною динамікою, а саме: стабільністю в лімфоцитах і незначним зменшенням ( $p < 0,05$ ) у нейтрофільних гранулоцитах щурів групи Д1 та різким пригніченням в обох досліджуваних фракціях клітин крові тварин групи Д2 (рис. 2). Ймовірно, у механізмах зменшення каталазної активності важливу роль відіграє інактивація молекул фермента продуктами ПОЛ за умов нагромадження їх у клітинах [9].

Отримані результати свідчать про особливості динаміки процесів ПОЛ у фракціях лейкоцитів, до складу яких входять різні за походженням і функціями клітини крові (нейтрофільні гранулоцити, лімфоцити), у тварин, отруєних тривалим надходженням до організму хлориду кадмію. Прояв прооксидантних ефектів катіонів  $Cd^{2+}$  у лейкоцитах значною мірою пов'язаний зі змінами в антиоксидантному статусі клітин. У зв'язку з особливостями адаптаційної відповіді на дію стресового чинника з боку антиоксидантної системи масштаби викликаного кадмієм оксидативного стресу неоднакові в нейтрофільних гранулоцитах і лімфоцитах тварин.

Надходження до організму щурів катіонів  $Cd^{2+}$  (внаслідок щодобового введення хлориду кадмію в дозі 3 мг/кг впродовж 14-ти діб) призводить до нагромадження в лейкоцитах (нейтрофільні гранулоцити, лімфоцити) кінцевих продуктів пероксидного окис-

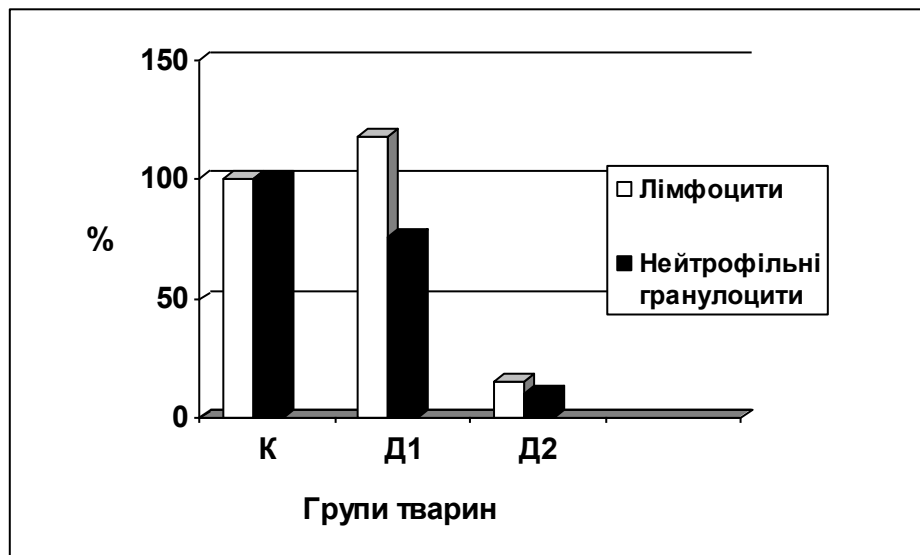


Рис. 3. Активність каталази в лейкоцитах щурів, отруєних хлоридом кадмію.

снення ліпідів, які взаємодіють з ТБК, що свідчить про активацію процесів ПОЛ у клітинах крові.

Отруєння щурів катіонами кадмію за умов тривалого введення  $\text{CdCl}_2$  (3 мг/кг) супроводжується неоднозначною динамікою активності ферментів-антиоксидантів (глутатіонпероксидаза, каталаза) в лейкоцитах упродовж 14-добового експериментального періоду. Зміни в ферментній активності полягають, головним чином, у збільшенні глутатіонпероксидазної та пригніченні каталазної активності в нейтрофільних гранулоцитах і лімфоцитах.

1. Антоняк Г. Л., Панас Н. С., Першин О. І., Бершадський В. І. Вплив сполук важких металів на процеси перекисного окиснення ліпідів та функціональну активність ферментів-антиоксидантів в еритроцитах тварин // Теорія та практика сучасного природознавства: Зб. наук. праць. Херсон: ПП Вишемирський В.С., 2005. С. 7–11.
2. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 724–727.
3. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. 391 с.
4. Beers R. F., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195. N 1. P. 133–140.
5. Biser J. A., Vogel L. A., Berger J. et al. Effects of heavy metals on immunocompetence of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) // J. Wildlife Dis. 2004. Vol. 40. N 2. P. 173–184.
6. Boyum A. A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968. Vol. 21. Suppl. 97. P. 51–76.
7. De Haan J. B., Crack P. J., Flentjar N. et al. An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant de-

- fense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse // *Redox Rep.* 2003. Vol. 8. N 2. P. 69–79.
8. *El-Benna J., Dang P. M., Gougerot-Pocidallo M. A., Elbim C.* Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 2005. Vol. 53. N 3. P. 199–206.
  9. *Ikediyi C. O., Badisa V. L., Ayuk-Takem L. T.* et al. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells // *Int. J. Mol. Med.* 2004. Vol. 14. N 1. P. 87–92.
  10. *Jurczuk M., Brzóška M. M., Moniuszko-Jakoniuk J.* et al. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol // *Food Chem. Toxicol.* 2004. Vol. 42. N 3. P. 429–438.
  11. *Klemke M., Wabnitz G. H., Funke F.* et al. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions // *Immunity*. 2008. Vol. 29. N 3. P. 404–413.
  12. *Lippolis J. D.* Immunological signaling networks: Integrating the body's immune response // *J. Anim. Sci.* 2008. Vol. 86. N 14 (suppl). P. E53–E63.
  13. *Mishell B. B., Shiigi S. M.* Selected Methods in Cellular Immunology // San Francisco; W. H. Freeman and Company. 1980. 486 p.
  14. *Omori K., Ohira T., Uchida Y.* et al. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase // *J. Leukoc. Biol.* 2008. Vol. 84. N 1. P. 292–301.
  15. *Satarug S., Baker J. R., Urbenjapol S.* et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population // *Toxicol. Lett.* 2003. Vol. 137. P. 65–83.
  16. *Satarug S., Moore M. R.* Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke // *Environ. Health Perspect.* 2004. Vol. 112. N 10. P. 1099–10103.
  17. *Shaikh Z. A., Vu T. T., Zaman K.* Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999. Vol. 154. N 3. P. 256–263.
  18. *Storz G., Tartaglia L. A., Ames B. N.* Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation // *Science*. 1990. Vol. 248. N 4952. P. 189–194.
  19. *Valko M., Morris H., Cronin M. T.* Metals, toxicity and oxidative stress // *Curr. Med. Chem.* 2005. Vol. 12. N 10. P. 1161–1208.

**EFFECTS OF CADMIUM CATIONS ON LIPID PEROXIDATION  
AND ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN LEUCOCYTES  
OF ANIMAL BLOOD**

**H. Antonyak\*, L. Biletska\*\***

*\*Ivan Franko National University of Lviv  
41, Doroshenko St., Lviv 79000, Ukraine*

*\*\*Lviv National Agrarian University  
1, V.Velykyi St., Dublyany-Lviv 80381, Ukraine*

The effects of prolonged administration (during 14 days) of cadmium chloride (3 mg/kg body weight) on intensity of lipid peroxidation and enzymes of antioxidant system in leucocytes of white rats were studied. It was established, that under an influence of cadmium the concentration of lipid peroxidation products (TBA-positive products) – were substantially increased in both the lymphocytes and neutrophilic granulocytes of animal blood. The activities of enzymes of antioxidant system in the leucocytes of rats changed in different ways during the experimental period, namely: catalase activity was diminished, and glutathione peroxidase activity was increased.

*Key words:* heavy metals, cadmium, leucocytes, lymphocytes, neutrophilic granulocytes, antioxidant system.

**ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ КАДМИЯ НА ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДНОГО  
ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ  
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ЖИВОТНЫХ**

**Г. Антоняк, Л. Билецкая**

*\*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Дорошенко, 41, Львов 79000, Украина*

*\*\*Львовский национальный аграрный университет  
ул. В. Великого, 1, Дубляны-Львов 80381, Украина*

В статье представлены результаты исследований влияния катионов кадмия (в условиях длительного введения в форме хлорида кадмия) на интенсивность процессов пероксидного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной системы в лейкоцитах белых крыс. Установлено, что на протяжении 14-суточного экспериментального периода существенно увеличивается концентрация конечных ТБК-активных продуктов окисления липидов. Активность ферментов-антиоксидантов в лимфоцитах и нейтрофильных гранулоцитах изменяется по-разному, а именно: каталазная активность снижается, а глутатионпероксидазная – увеличивается.

*Ключевые слова:* тяжелые металлы, кадмий, лейкоциты, лимфоциты, нейтрофильные гранулоциты, антиоксидантная система.

Стаття надійшла до редколегії 27.05.09  
Надійшла після доопрацювання 10.07.09  
Прийнята до друку 09.09.09