

Praca oryginalna

Original paper

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w krwi królików eksponowanych na wzmożoną podaż żelaza

ROMAN ALEKSIEWICZ, KATARZYNA PAWŁOWSKA-GÓRAL*,
IZABELA MACIEJEWSKA-PASZEK**, MARIA WARDAS**

Lecznica dla zwierząt, ul. Wróbla 10a, 41-100 Siemianowice Śląskie

*Katedra i Zakład Chemii Ogólnej i Analitycznej oraz **Katedra i Zakład Żywności i Żywienia
Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

Aleksiewicz. R., Pawłowska-Góral K., Maciejewska-Paszek I., Wardas M.

The activity of antioxidative enzymes in the blood sampled from rabbits exposed to an increased supply of iron

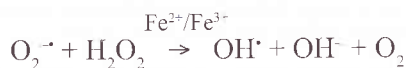
Summary

The activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in the blood sampled from rabbits after 3, 10 and 90 days after the administration of Jectofer (Astra D, Bosnalijec, YU) (iron specimen) in the amount of 15 mg per 1 kg of body mass per day were evaluated. Already on the third day of the experiment the activity of SOD increased but GPx decreased. Starting from the 10th day of the experiment the activity of SOD was decreasing, but even on the 90th day it did not reach the value determined in the rabbits' blood before the beginning of the experiment. Simultaneously with the decrease of SOD activity from the 10th day of the experiment, the GPx activity increased.

The observed changes of enzymes' activity after administration of Jectofer to rabbits prove that the iron ions disrupt enzymatic homeostasis. These changes are probably connected with the accumulation of iron in the liver.

Keywords: superoxide dismutase, glutathione peroxidase, iron

Wśród wielu właściwości jonów żelaza na uwagę zasługuje stosunkowa łatwość zmiany ich stopnia utleniania, co zachodzi również w komórkach organizmów żywych. Wiadomo, że jony żelaza biorą czynny udział w reakcji powstawania rodnika wodorotlenkowego (zwanego czasem rodnikiem hydroksylowym) z nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenu w tzw. reakcji Habera-Weisa (4).



Katalityczna rola jonów żelaza sprawia, że nawet niewielka ich ilość w sposób istotny stymuluje powyższą reakcję (5). Aczkolwiek reakcja Habera-Weisa w warunkach fizjologicznych nie ma istotnego znaczenia, konsekwencją ingerencji jonów żelaza w homeostazę oksydacyjno-redukcyjną komórek jest jego cytotoksyczność (10, 14, 15). Jednym z ważniejszych przejawów tej toksyczności jest stymulacja procesu peroksydacji lipidów (6, 11).

Kumulacja jonów żelaza w hepatocytach jest jednym z powodów powstawania procesów zwłóknienia i marskości wątroby (8, 12-14), a więc procesów, u podstaw których leżą istotne zmiany w tkance łącznej narządu. Zmiany te są efektem zakłócenia metabolizmu składników tkanki łącznej w tym również glikozoaminoglikanów, które są podstawowym składnikiem macierzy pozakomórkowej tej tkanki (1, 2). Obserwowane u królików narażonych na wzmożoną podaż żelaza zmiany w obrębie glikozoaminoglikanów tkanki łącznej wątroby dotyczą nie tylko zwiększenia ich ilości (1), ale przede wszystkim wzrostu udziału ilościowego siarczanowych glikozoaminoglikanów, tj. siarczanu chondroityny i siarczanu dermatanu (2).

Celem badań była ocena modyfikującego oddziaływania jonów żelaza, podawanych królikom pod postacią preparatu Jectofer, na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, oznaczoną w krwi zwierząt.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 28 samcach królików rasy szynszyle, o masie 3,2±0,1 kg. Zwierzęta przez cały czas eksperymentu pozostawały na pełnowartościowej diecie i były pojone wodą *ad libitum*, przetrzymywane były w klatkach pojedynczo, w temperaturze pokojowej, przy naturalnym oświetleniu.

Zwierzęta otrzymywały przez 90 dni w formie iniekcji domięśniowych preparat żelaza Jectofer (Astra, D, Bosnalijec, YU) w ilości 15 mg/kg m.c./dobę. Wszystkim zwierzętom przed rozpoczęciem podawania preparatu żelaza oraz po 3, 10 i 90 dniach trwania eksperymentu pobierano krew z żyły brzeżnej ucha. W pobranej krwi oznaczano rutynowo hemoglobinę oraz aktywność dysmutazy ponadtlenu (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx). W surowicy uzyskanej z pobranej krwi oznaczano aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (AST).

Aktywność ALT i AST oznaczano przy pomocy zestawów testów produkcji Pointe Scientific. Aktywność SOD oznaczano za pomocą testów angielskiej firmy Randox opracowanych na podstawie metody Beauchamp i Fridovich (3). Oznaczenia wykonano w termostatowej kuwecie w spektrofotometrze UV – VIS Unicam UV-2 przy długości fali 505 nm. Aktywność enzymu podawano w jednostkach na 1 gram hemoglobiny (U/g Hb). Aktywność GPx oznaczano za pomocą testów firmy Randox opracowanych na podstawie metody Paglia i Valentine (9). Oznaczenia przeprowadzono w termostatowej kuwecie w spektrofotometrze UV – VIS Unicam UV-2 przy długości fali 340 nm. Aktywność enzymu podano w jednostkach na 1 g hemoglobiny (U/g Hb).

Wyniki i omówienie

Wyniki oznaczeń aktywności aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej dowodzą, że już 10-dniowe podawanie królikom preparatu żelaza spowodowało uszkodzenie wątroby. Dowodem tego był obserwowany około 34% wzrost aktywności AST i około 50% wzrost aktywności

**Tab. 1. Aktywność aminotransferazy alani-
nowej (ALT) i asparaginianowej (AST) w
surowicy badanych królików (n = 7; $\bar{x} \pm s$)**

Czas eksperymentu (dni)	ALT (U/L)	AST (U/L)
0	10,39 ± 0,88	13,90 ± 2,30
3	10,40* ± 1,20	13,80* ± 2,00
10	13,90* ± 0,90	20,90* ± 3,80
90	35,50* ± 3,29	58,80* ± 4,65

Objaśnienie: * p ≤ 0,01 w porównaniu do kontroli (grupa 0)

ALT. Po 90 dniach podawania królikom preparatu żelaza aktywność obu enzymów zwiększyła się w porównaniu z grupą kontrolną; w przypadku AST ponad trzykrotnie, zaś w przypadku ALT ponad 4-krotnie.

Aktywność SOD w krwi w 3 dniu eksperymentu użyła najwyższą wartość, przekraczającą aż 2,5-krotnie aktywność enzymu oznaczoną u królików przed rozpoczęciem eksperymentu. W dalszym czasie trwania eksperymentu, tj. po 10 i 90 dniach aktywność SOD obniżyła się i w 90 dniu była już tylko o 47% wyższa od wyjściowej.

W przypadku GPx aktywność w 3 dniu eksperymentu obniżyła się o około 35% w porównaniu z aktywnością oznaczoną u królików przed rozpoczęciem eksperymentu. Jednakże w następnych dniach eksperymentu aktywność GPx wzrastała i w 90 dniu była wyższa od wyjściowej o około 13%.

Inspiracją do podjęcia badań dotyczących zmian aktywności SOD i GPx w krwi królików narażonych na wzmożoną podaż żelaza były uzyskane i opublikowane wyniki badań własnych (1, 2) dotyczących zmian w glikoaminoglikanach izolowanych z wątrób królików traktowanych identycznie jak w eksperymencie przedstawionym w niniejszej pracy. Powodów obserwowanych zmian w glikoaminoglikanach upatrywano w naruszeniu ustrojowej homeostazy oksydacyjno-redukcyjnej, spowodowanym podawaniem królikom preparatu żelaza. Przypuszczenia te znalazły potwierdzenie w niniejszej pracy, w której stwierdzono zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej, a więc dwóch enzymów odpowiedzialnych za zachowanie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej nie tylko komórek, ale i narządów. Obserwowany w 3 dniu eksperymentu ponad 2,5-krotny wzrost aktywności SOD wskazuje na ostre zakłócenie jonami żelaza homeostazy oksydacyjnej organizmu. Natomiast powolny spadek aktywności SOD może dowodzić uruchomieniu określonych mechanizmów obronnych przed podwyższonym stężeniem jonów żelaza. Takim mechanizmem być może jest kumulacja żelaza w obrębie wątroby, co wykazano we wcześniejszych badaniach własnych (7).

Odnotowane w niniejszej pracy zmiany aktywności SOD sugerowałyby, nieco inne niż obserwowano, zmiany aktywności GPx. Podwyższeniu aktywności SOD towarzyszy wzrost stężenia nadtlenu wodoru, ponieważ jest on produktem reakcji SOD. Podwyższone stężenie nadtlenu wodoru powinno powodować wzrost aktywności GPx, tymczasem po 3 dniach trwania eksperymentu aktywność GPx była najniższa, a co interesujące niższa od aktywności oznaczonej u zwierząt przed rozpoczęciem eksperymentu. Sprawność enzymatyczna peroksydazy glutationowej jest uwarunkowana dostateczną podażą zredukowanego glutationu. Powodem niedoboru zredukowanego glutationu może być zakłócenie

Tab. 2. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) w krwi badanych królików (n = 7; $\bar{x} \pm s$)

Czas eksperymentu (dni)	SOD (U/gHb)	GPx (U/gHb)
0	263,0 ± 18,12	8,75 ± 1,82
3	674,6* ± 32,81	5,72* ± 1,30
10	603,6* ± 30,20	6,88* ± 2,01
90	387,0* ± 22,30	9,91* ± 2,03

Objaśnienie: jak w tab. 1.

był spowodowany niedoborem glutationu wynikającym z upośledzenia procesów dostarczających NADPH, a to być może jest odległym skutkiem podawania królikom preparatu żelaza. Ponowny wzrost aktywności GPx (podobnie jak przypadający na ten sam okres eksperymentu spadek aktywności SOD) jest prawdopodobnie efektem nasilającego się procesu kumulacji żelaza w wątrobie.

Piśmiennictwo

- Aleksiewicz R., Maciejewska-Paszek I., Skiba M., Wardas M., Stec M.: Skutki nadmiernej podaży żelaza królikom w aspekcie zmian ilościowych glikoaminoglikanów w ich wątróbach. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 58-60.
- Aleksiewicz R., Wardas M., Maciejewska-Paszek I., Skiba M., Pawłowska-Góral K.: Wpływ preparatu żelaza (Jectofer) na zawartość kwasu hialuronowego, siarczanu heparanu, siarczanu dermatanu i siarczanu chondroityny w wątrobie królików. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 528-530.
- Beauchamp C., Fridovich K.: Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971, 99, 276.
- Egawa H., Higashiyama H., Iwata S., Mori K., Sasada M., Kagawa R., Wada Y., Shimahara Y., Ozawa K.: Decreased adenylate energy charge and superoxide anion release in polymorphonuclear leukocytes in septic patients after hepatectomy. *Circ. Shock.* 1993, 39, 293-298.
- Kondo S., Segawa T., Tanaka K., Izawa K., Hashida M., Kanematsu T.: Mannosylated superoxide dismutase inhibits hepatic reperfusion injury in rats. *J. Sur. Res.* 1996, 60, 36-40.
- Li C. Y., Watkins J. A., Hamazaki S., Altazan J. D., Glass J.: Iron binding, a new function for the reticulocyte endosome H(+)-ATPase. *Biochemistry* 1995, 34, 5130-5136.
- Maciejewska-Paszek I., Skiba M., Pawłowska-Góral K., Wardas M.: Wpływ nadmiernej podaży żelaza na zmiany czynności i struktury wątroby królików. *Ann. Acad. Med. Siles.* 1999, 40-41, 33-42.
- Muntané J., Puig-Parellada P., Mitjavila M. T.: Iron metabolism and oxidative stress during acute and chronic phases of experimental inflammation: Effect of iron-dextran and deferoxamine. *J. Lab. Clin. Med.* 1995, 126, 435-443.
- Paglia D. E., Valentine W.: Studies of the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin.* 1967, 70, 158.
- Poulos J. E., Bacon B. R.: Liver transplantation for hereditary hemochromatosis. *Dig. Dis.* 1996, 14, 316-322.
- Qian Z. M., Tang P. L., Morgan E. H.: Effect of lipid peroxidation on transferrin-free iron uptake by rabbit reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1310, 293-302.
- Raha Chowdbury R., Bowen D. J., Worwood M.: A new highly polymorphic marker in the 5' untranslated region of HLA-F shows strong allelic association with hemochromatosis. *Hum. Genet.* 1996, 97, 228-231.
- Roeles S., Ducatelle R., Cornelissen H.: Quantitative image analysis as an alternative to chemical analysis for follow-up of liver biopsies from a toucan with hemochromatosis. A technique with potential value for the follow-up of hemochromatosis in humans. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1996, 18, 221-224.
- Sing K. G., Pace R., Prior S., Scott S. D. J., Shield P., Martin N., Searle J., Battersby C., Powell W., Graham W., Cooksley E.: Establishment of a cell line from a hepatocellular carcinoma from a patient with hemochromatosis. *Hepatology* 1994, 20, 74-81.
- Zhao M., Matter K., Laissue J. A. and Zimmermann A.: Copper/zinc and manganese superoxide dismutase immunoreactivity in hepatic iron overload diseases. *Histol. Histopathol.* 1995, 10, 925-935.

Adres autora: dr Roman Aleksiewicz, ul. Wróbla 10a, 41-100 Siemianowice Śląskie