

Wpływ kadmu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w izolowanych hepatocytach szczura

HANNA CZECZOT, DOROTA ŚCIBIOR-BENTKOWSKA, MICHAŁ SKRZYCKI, MAŁGORZATA PODSIAD, WOJCIECH KARLIK*, ADAM BĄKAŁA*, DANUTA GRONO*, MARIA WIECHETEK*

Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

*Zakład Farmakologii i Toksykologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Czczot H., Ścibior-Bentkowska D., Skrzycki M., Podsiad M., Karlik W., Bąkała A., Grono D., Wiechetek M.
Effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in isolated rat hepatocytes

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of cadmium on the antioxidant enzyme activity in rat hepatocytes. The experiments were conducted on isolated rat hepatocytes, which were incubated for two hours in modified Williams' E medium (MWE) with 25, 50, and 200 μM cadmium chloride (CdCl_2). Hepatocytes incubated in MWE medium without cadmium chloride were used as a control. The activity of antioxidant enzymes – superoxide dismutases (SOD1 and SOD2), catalase (CAT), total glutathione peroxidase (tot. GSHPx), selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GSHPx), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GSHR) – and the values of the studied oxidative stress markers – the concentration of thiobarbituric-acid-reacting substances (TBARS) and reduced glutathione (GSH) – indicate that cadmium induces oxidative stress in rat hepatocytes, which impairs antioxidative mechanisms.

Keywords: cadmium, isolated rat hepatocytes, oxidative stress, antioxidant enzymes

Wśród chemicznych zanieczyszczeń środowiska stanowiących poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt szczególne miejsce zajmuje kadm (Cd^{2+}). Ten powszechnie występujący w środowisku metal ciężki, jest obecny w powietrzu, glebie, wodzie oraz w tkankach roślin i zwierząt (13). W organizmie ludzi i zwierząt kadm kumuluje się przede wszystkim w nerkach i wątrobie (15). Narządami narażonymi na działanie tego metalu są również: płuca, kości i układ immunologiczny (5). Kadm jest pierwiastkiem o udowodnionym działaniu nefrotoksycznym, hepatotoksycznym i neurotoksycznym oraz działaniu odległym: mutagennym i kancerogennym. Zalicza się go do czynników środowiskowych o działaniu rakotwórczym dla ludzi (kategoria A1) (1). Ekspozycja na działanie kadmu prowadzi do indukcji nowotworów nerek, trzustki, płuc i prostaty (29, 30).

Wielokierunkowy charakter toksycznego działania kadmu na organizm wynika z jego interakcji z cynkiem (Zn), miedzią (Cu) żelazem (Fe) i selenem (Se) polegającej, między innymi, na wzajemnym wypieraniu się z kompleksów z metalotioneiną oraz z wiąza-

nia się z reaktywnymi grupami funkcyjnymi ważnych biologicznie makrocząsteczek (np. -SH, -OH, -COOH, NH_2 , $-\text{PO}_3\text{H}_2$, w których atomy N i O są donorami elektronów) (20). Działanie kadmu może prowadzić do zaburzenia czynności narządów i układów organizmu. Mimo intensywnych badań mechanizm toksycznego działania kadmu na organizmy żywe nie został do końca poznany. Obecny stan wiedzy wskazuje, że toksyczne działanie kadmu na komórki organizmu może być wynikiem różnych mechanizmów. Jednym z nich może być zaburzenie w komórkach homeostazy oksydacyjno-redukcyjnej, czego konsekwencją jest indukcja stresu oksydacyjnego, osłabienie systemu antyoksydacyjnego i utrata integralności błon komórkowych (21, 25, 27).

Biorąc po uwagę fakt, iż wątroba obok nerek jest organem narażonym zarówno na kumulację, jak i toksyczne działanie kadmu, podjęto badania mające na celu określenie wpływu tego metalu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w izolowanych hepatocytach szczura. Do realizacji badań wykorzystano izolowane hepatocyty szczura jako alternatywny model ba-

dawczy *in vitro*, uznany powszechnie za odpowiedni do badania metabolizmu ksenobiotyków oraz działania hepatotoksycznego i ogólnego działania cytotoksycznego.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano szczury szczepu Wistar (samce) o masie ciała 200-250 g.

W czasie kwarantanny (2 tygodnie) i przed samym eksperymentem zwierzęta miały wolny dostęp do wody i karmy.

Izolowanie i inkubacja hepatocytów z chlorkiem kadmu (CdCl₂). Hepatocyty izolowano z wątrób szczurów zgodnie z protokołem INVITTOX Nr 20 obejmującym: wykonanie zabiegu chirurgicznego, przeprowadzenie dwustopniowej perfuzji wątroby, otrzymanie zawiesiny izolowanych hepatocytów oraz jej jakościowa i ilościowa ocena. Do badań wykorzystano komórki, których przeżywalność oznaczana testem wychwytu błękitu trypanu (28) przekraczała 85%. Izolowane hepatocyty (1×10^6 żywych komórek/ml) inkubowano przez 2 godziny w modyfikowanym (pozbawionym fosforanów i węglanów) medium Williams' E (MWE) o pH 7,35 w obecności chlorku kadmu w stężeniach: 25, 50 i 200 μ M. Układ kontrolny stanowiły hepatocyty inkubowane w hodowlanym medium MWE bez dodatku chlorku kadmu. Inkubację hepatocytów przeprowadzano w kolbkach Erlenmayera w łaźni wodnej (Hermle-Labortechnik, Niemcy) o temperaturze 38°C, ze stałym wytrząsaniem (100 cykli na minutę). Podczas inkubacji zawiesinę hepatocytów wysycano karbogenem (5% CO₂ + 95% O₂). Próbkę do analiz pobierano w momencie rozpoczęcia oraz po 1. i 2. godzinie inkubacji. Wykonano 3 oddzielne doświadczenia.

Izolowanie i inkubację hepatocytów z chlorkiem kadmu przeprowadzono w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii SGGW. Na wykonanie badań uzyskano zgodę III Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW w Warszawie (Nr 16/2006).

Badania biochemiczne. Przed i po 1- i 2-godzinnej inkubacji w zawieszynie hepatocytów oznaczono aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1 i SOD2), katalazy (CAT), całkowitej peroksydazy glutationowej (cał. GSHPx), selenozależnej peroksydazy glutationowej (SeGSHPx), transferazy glutationowej (GST) i reduktazy glutationowej (GSHR) oraz markery stresu oksydacyjnego: stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), które określa poziom peroksydacji lipidów i stężenie zredukowanego glutationu (GSH). Ponadto oznaczano stężenie białka całkowitego w hepatocytach. Wszystkie oznaczenia wykonano na Katedrze i Zakładzie Biochemii WUM.

Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Aktywność miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej (CuZnSOD; SOD1) (EC 1.15.1.1) oznaczano za pomocą zestawu RANSOD firmy RANDOX (Wielka Brytania). W metodzie tej w reakcji ksantyny z oksydazą ksantynową powstaje anionorodnik ponadtlenkowy, który redukuje chlorek 2-(4-jodofenylo)-3(4-nitrofenylo)-5-5 fenylotetrazylu (INT), tworząc barwny formazan. Aktywność manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD; SOD2)

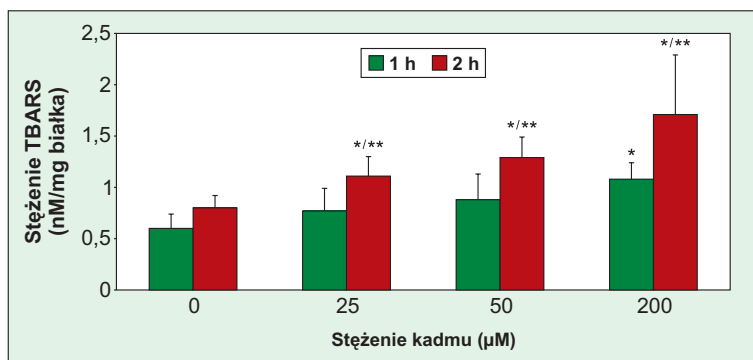
(EC 1.15.1.1) oznaczano wg metody Beauchamp i Fridovich (3), zmodyfikowanej przez Oberleya i Spitzza (16). Powstający w reakcji ksantyny z oksydazą ksantynową anionorodnik ponadtlenkowy redukuje chlorek błękitu nitrotetrazolowego – NBT (chlorek 2,2'-di-p-nitrofenylo-5,5'-difenylo-3,3'-[3,3'-dimetoxy-4,4'difenyleno]-ditetrazolu), tworząc barwny kompleks. Aktywność katalazy (CAT) (EC 1.11.1.6) oznaczano wg Goth (10). Metoda polega na pomiarze szybkości rozkładu nadtlenu wodoru. Całkowita aktywność peroksydazy glutationowej (cał. GSHPx) (EC 1.11.1.9) oznaczano wg metody Wendel (32). W metodzie tej GSHPx katalizuje utlenianie GSH przy udziale nadtlenu kumenu. Aktywność selenozależnej peroksydazy glutationowej (Se-GSHPx) (EC 1.11.1.9) oznaczano na podstawie metody opisanej przez Wendel (32) oraz Paglia i Valentine (18). W metodzie tej Se-GSHPx katalizuje utlenianie GSH przy udziale nadtlenu wodoru. Aktywność transferazy glutationowej (GST) (EC 2.5.1.18) oznaczano wg metody Habig i wsp. (11), stosując jako substrat 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB). Aktywność reduktazy glutationowej (GSHR) (EC 1.6.4.2) oznaczano według metody opisanej przez Goldberg i Spooner (9). Jako substratu użyto utlenionego glutationu (GSSG).

Oznaczenia markerów stresu oksydacyjnego. Poziom peroksydacji lipidów oznaczano wg metody Ohkawa i wsp. (17). Metoda polega na oznaczeniu stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) – dialdehydu malonowego (MDA) i innych wtórnych produktów peroksydacji lipidów. Stężenie zredukowanego glutationu (GSH) oznaczano na podstawie metody opracowanej przez Ellman (7), Sedlak i Lindsay (23). Metoda ta oparta jest na tworzeniu barwnego produktu, który powstaje w reakcji GSH z kwasem 5,5'-ditio-bis-nitrobenzenowym (DTNB). Stężenie białka oznaczano zgodnie z metodą Bradford (4).

Aktywność badanych enzymów wyrażono w U/mg białka. Stężenie GSH i TBARS wyrażono odpowiednio w μ mol/mg białka i nmol/mg białka. Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono wykorzystując testy analizy wariancji (ANOVA). Istotność różnic oznaczono testem t-Studenta. Różnice między średnimi arytmetycznymi przyjęto za istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$.

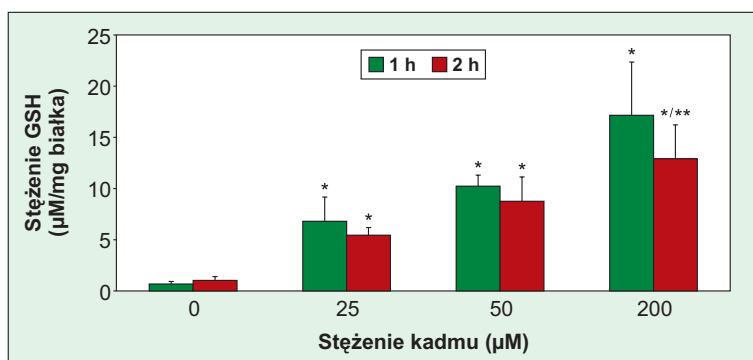
Wyniki i omówienie

Zmiany w poziomie markerów stresu oksydacyjnego. Ekspozycja izolowanych hepatocytów szczura na chlorek kadmu (25, 50 i 200 μ M) doprowadzała do podwyższenia poziomu peroksydacji lipidów ocenianego na podstawie stężenia TBARS (ryc. 1). Stopień wzrostu stężenia TBARS zależał zarówno od czasu ekspozycji komórek na kadm, jak i od stężenia kadmu. W przypadku hepatocytów inkubowanych w obecności kadmu przez 1 godzinę istotne podwyższenie poziomu peroksydacji lipidów (w porównaniu do stwierdzonego w hepatocytach kontrolnych) obserwowano jedynie w komórkach ekspozycyjnych na chlorek kadmu w stężeniu 200 μ M (ryc. 1). Dłuższe (dwugodzinne) narażenie hepatocytów na chlorek kadmu dopro-



Ryc. 1. Wpływ chlorku kadmu na poziom peroksydacji lipidów w izolowanych hepatocytach szczura

Objaśnienia: jak w tab. 1



Ryc. 2. Wpływ chlorku kadmu na stężenie GSH w izolowanych hepatocytach szczura

Objaśnienia: jak w tab. 1

wadzało do wyraźnego wzrostu stężenia TBARS w ko- w stężeniu 200 µM (tab. 1).

mórkach; istotny, w porównaniu do hepatocytów kontrolnych, wzrost stężenia TBARS stwierdzano już w hepatocytach eksponowanych na chlorek kadmu w najniższym (25 µM) stosowanym w doświadczeniu stężeniu (ryc. 1). Jednocześnie stwierdzony w tych warunkach poziom peroksydacji lipidów był istotnie wyższy od obserwowanego w komórkach poddanych 1-godzinnej ekspozycji na chlorek kadmu w stężeniu 25 µM. Ekspozycja hepatocytów na kadm w wyższych (50 i 200 µM) stężeniach doprowadzała do dalszego wzrostu poziomu peroksydacji lipidów; najwyższe stężenie TBARS obserwowano w hepatocytach inkubowanych przez 2 godziny w obecności chlorku kadmu w stężeniu 200 µM (ryc. 1).

Ekspozycja hepatocytów na chlorek kadmu doprowadzała również do wyraźnego wzrostu stężenia zredukowanego glutationu (GSH) w komórkach (ryc. 2). Statystycznie istotny wzrost stężenia GSH

(w porównaniu z układem kontrolnym) stwierdzano już podczas inkubacji hepatocytów w obecności kadmu w najniższym stosowanym w doświadczeniu stężeniu (25 µM). Ekspozycja hepatocytów na kadm w wyższych stężeniach (50 i 200 µM) prowadziła do dalszego wzrostu stężenia GSH, przy czym stężenie GSH w hepatocytach narażonych na działanie chlorku kadmu przez 2 godziny było niższe od obserwowanego po jednogodzinnej ekspozycji komórek na ten metal (ryc. 2). Statystycznie istotne różnice stwierdzano w przypadku hepatocytów eksponowanych na kadm w stężeniu 200 µM; stężenie GSH w hepatocytach poddanych dwugodzinnej ekspozycji było o 26,3% niższe od stwierdzonego po jednogodzinnym narażeniu komórek na kadm (ryc. 2).

Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych przedstawiono w tab. 1. Statystycznie istotny wzrost aktywności SOD1 i SOD2 w hepatocytach (w porównaniu z układem kontrolnym) stwierdzono w komórkach eksponowanych przez jedną lub dwie godziny na kadm w stężeniu 50 i 200 µM. Najwyższą aktywność obu izoenzymów SOD stwierdzono w hepatocytach eksponowanych na chlorek kadmu w stężeniu 200 µM. Znamienne różnice aktywności enzymów, zależne od czasu ekspozycji komórek na kadm stwierdzono tylko w odniesieniu do aktywności SOD1 i jedynie w przypadku narażenia komórek na kadm

Tab. 1. Wpływ chlorku kadmu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w izolowanych hepatocytach szczura

Aktywność enzymów U/mg białka	Czas ekspozycji (godz.)	Stężenie chlorku kadmu			
		0	25	50	200
SOD1	1	1,84 ± 0,47	2,19 ± 0,50	2,50 ± 0,50*	2,90 ± 0,66*
	2	1,75 ± 0,44	1,95 ± 0,33	2,25 ± 0,62*	3,42 ± 0,76*/**
SOD2	1	1,23 ± 0,25	1,60 ± 0,30	1,84 ± 0,49*	2,26 ± 0,85*
	2	1,48 ± 0,20	1,60 ± 0,25	1,96 ± 0,20*	2,56 ± 0,68*
CAT	1	265,40 ± 63	474,07 ± 195*	577,80 ± 106*	709,00 ± 195*
	2	267,50 ± 75	473,80 ± 137*	495,80 ± 63*	332,80 ± 48 */**
cał. GSHPx	1	0,50 ± 0,10	0,60 ± 0,13	0,66 ± 0,05	0,67 ± 0,16
	2	0,43 ± 0,15	0,44 ± 0,11**	0,47 ± 0,07**	0,49 ± 0,15**
Se-GSHPx	1	0,36 ± 0,10	0,33 ± 0,09	0,30 ± 0,03	0,39 ± 0,10
	2	0,28 ± 0,10	0,28 ± 0,14	0,33 ± 0,05	0,32 ± 0,13**
GST	1	0,25 ± 0,02	0,31 ± 0,02*	0,34 ± 0,04*	0,44 ± 0,07*
	2	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,36 ± 0,07*	0,37 ± 0,03*/**
GSHR	1	0,055 ± 0,01	0,056 ± 0,02	0,066 ± 0,01	0,083 ± 0,02*
	2	0,085 ± 0,02	0,100 ± 0,02**	0,13 ± 0,06*/**	0,18 ± 0,05*/**

Objaśnienia: * – różnica statystycznie istotna w odniesieniu do układu kontrolnego ($p \leq 0,05$); ** – różnica statystycznie istotna w odniesieniu do 1-godzinnej ekspozycji hepatocytów szczura na chlorek kadmu ($p \leq 0,05$); układ kontrolny stanowiły hodowle hepatocytów inkubowane w medium MWE bez dodatku chlorku kadmu

Ekspozycja hepatocytów na kadm doprowadzała do wzrostu aktywności CAT; znamieny (w porównaniu z układem kontrolnym) wzrost aktywności enzymu stwierdzano już w hepatocytach inkubowanych (przez jedną lub dwie godziny) w obecności chlorku kadmu w stężeniu 25 μM . Jednogodzinne narażenie komórek na kadm w wyższych stężeniach (50, 200 μM) doprowadzało do znacznego, zależnego od stężenia kadmu podwyższenia aktywności CAT (tab. 1). Aktywność CAT w hepatocytach eksponowanych przez 2 godziny na chlorek kadmu w stężeniu 200 μM była statystycznie istotnie niższa od obserwowanej w hepatocytach inkubowanych w obecności kadmu w takim samym stężeniu przez 1 godzinę (tab. 1).

Aktywność cał. GSHPx i Se-GSHPx w hepatocytach eksponowanych przez jedną lub dwie godziny na chlorek kadmu (25, 50 i 200 μM) nie różniła się istotnie od aktywności tych enzymów w hepatocytach inkubowanych w medium MWE bez dodatku kadmu (tab. 1). Wyraźne zmiany aktywności wymienionych enzymów obserwowano natomiast w hepatocytach narażonych na działanie kadmu w zależności od czasu ekspozycji komórek na ten metal. W hepatocytach poddanych dwugodzinnej ekspozycji na kadm istotnie niższą (od obserwowanej po jednogodzinnej ekspozycji) aktywność cał. GSHPx stwierdzono w hepatocytach inkubowanych w obecności kadmu w stężeniach: 25, 50 i 200 μM , a aktywność Se-GSHPx jedynie w komórkach eksponowanych na kadm w stężeniu 200 μM (ale wyższą w porównaniu z kontrolą) (tab. 1).

Aktywność GST w hepatocytach eksponowanych przez jedną lub dwie godziny na chlorek kadmu była wyższa w porównaniu do stwierdzonej w hepatocytach kontrolnych; po jednogodzinnej ekspozycji komórek na kadm istotny wzrost aktywności GST stwierdzano już w hepatocytach inkubowanych w obecności kadmu w najniższym stosowanym stężeniu (25 μM), a po dwugodzinnej ekspozycji w hepatocytach eksponowanych na kadm w dwukrotnie wyższym (50 μM) stężeniu. Najwyższą aktywność GST stwierdzono po jednogodzinnej ekspozycji komórek na kadm w stężeniu 200 μM ; dwugodzinne narażenie hepatocytów na kadm w tym stężeniu doprowadzało do istotnego obniżenia aktywności GST (tab. 1).

W hepatocytach eksponowanych przez jedną godzinę na kadm istotną zmianę aktywności GSHR stwierdzono jedynie w komórkach inkubowanych w obecności kadmu w najwyższym (200 μM) stosowanym stężeniu. Dwugodzinne narażenie komórek na działanie kadmu doprowadzało do znacznego, zależnego od stężenia kadmu, statystycznie istotnego podwyższenia aktywności GSHR: znamieny (w porównaniu z układem kontrolnym i krótszym czasem ekspozycji) wzrost aktywności enzymu stwierdzano już w komórkach eksponowanych na kadm w stężeniu 25 μM (tab. 1).

Mechanizm toksycznego działania kadmu nie jest dobrze poznany. Wiadomo z piśmiennictwa, że pier-

wiąstek ten bezpośrednio nie uczestniczy w powstawaniu wolnych rodników tlenowych i ich reaktywnych form (RFT) (14). Ważną rolę w ochronie komórek przed jego toksycznym działaniem wydają się pełnić enzymy antyoksydacyjne i drobnocząsteczkowe antyoksydanty (8, 25).

Uzyskane wyniki wskazują, że mechanizm toksycznego działania kadmu na hepatocyty szczura wiąże się z indukcją stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji z osłabieniem systemu antyoksydacyjnego komórek. Wyrazem tego jest podwyższenie poziomu peroksydacji lipidów (TBARS) i wyraźny wzrost stężenia zredukowanego glutationu (GSH) w hepatocytach eksponowanych przez 1 i 2 godziny na działanie różnych dawek chlorku kadmu w porównaniu z układem kontrolnym. Dla obu markerów stresu oksydacyjnego stwierdzono zależność czas-dawka-efekt.

Podwyższony poziom peroksydacji lipidów w izolowanych hepatocytach eksponowanych na działanie kadmu wskazuje, że metal ten zwiększa w komórkach ilość RFT. Jest to możliwe w wyniku uwolnienia przez kadm metali przejściowych z miejsc ich naturalnego występowania w komórkach. Kadm, wiążąc się z ceruloplazminą lub ferrytyną w wątrobie, może wypierać z nich jony żelaza i miedzi, które biorą udział w powstawaniu najbardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona (5, 20, 27, 30). Według danych piśmiennictwa, kadm może również uszkadzać mitochondria, co prowadzi do uwolnienia Fe^{+2} z kompleksów enzymatycznych, wchodzących w skład łańcucha oddechowego. Jeszcze inną możliwością wytwarzania RFT w wyniku działania kadmu jest zahamowanie aktywności III kompleksu łańcucha oddechowego (oksydoreduktaza cytochromu c), odpowiedzialnego za transport elektronów z ubichnonu na cytochrom c (6, 31).

Wzrost stężenia GSH w hepatocytach eksponowanych przez 1 i 2 godziny na kadm w porównaniu z układem kontrolnym również wskazuje na stres oksydacyjny. Fakt znacznego obniżenia ilości GSH w hepatocytach eksponowanych przez 2 godziny na kadm w wysokim stężeniu w porównaniu od obserwowanego po jednogodzinnej ekspozycji komórek na ten metal świadczy o aktywnym udziale GSH w obronie komórek przed działaniem RFT.

Wykazanie w niniejszej pracy, że kadm w wysokich stężeniach i przy długim czasie ekspozycji może wtórnie obniżać stężenie GSH w izolowanych hepatocytach szczura (co przyczynia się do powstawania w nich nadmiaru RFT) jest zgodne z wynikami opublikowanymi przez Pourahmad i O'Brien (20).

Wiadomo, że powstawanie dużych ilości RFT w hepatocytach prowadzi do zużywania mechanizmów antyoksydacyjnych i wyczerpywania zdolności obronnych komórek przed skutkami ich działania (14). Hepatocyty mają ograniczoną zdolność do funkcjonowania w warunkach stresu oksydacyjnego (21). Niewydolność systemu antyoksydacyjnego zmniejsza elimi-

nację RFT z komórek wątroby, co jeszcze bardziej nasila w nich uszkodzenia struktur komórkowych i prowadzi do utraty ich integralności.

Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że narażenie hepatocytów na kadm doprowadza do obniżenia w nich potencjału antyoksydacyjnego. Osłabienie antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych w hepatocytach manifestowało się zmianami aktywności badanych enzymów antyoksydacyjnych.

Wzrost aktywności SOD1 i SOD2 w hepatocytach obserwowany po jedno- i dwugodzinnym narażeniu komórek na kadm (zwłaszcza w wyższych dawkach) wskazuje na próbę adaptacji komórek wątroby do funkcjonowania w warunkach silnego stresu oksydacyjnego. Wyższa aktywność katalazy stwierdzona w hepatocytach narażonych przez 1 godzinę na działanie kadmu (w porównaniu z układem kontrolnym) świadczy, że komórki bronią się przed nadmiarem powstałego w wyniku działania SOD nadtlenu wodoru. Spadek aktywności tego enzymu w drugiej godzinie ekspozycji hepatocytów na kadm w najwyższym stosowanym w doświadczeniu stężeniu (100 μM) sugeruje, że aktywność katalazy jest hamowana. Prawdopodobnie dochodzi do wyparcia z grupy prostetycznej katalazy Fe^{++} , co manifestuje się obniżeniem aktywności enzymu (6). Dwugodzinne narażenie izolowanych hepatocytów na kadm w wysokim stężeniu powoduje nie tylko wtórny spadek stężenia GSH (w porównaniu do wartości stwierdzanych po jednogodzinnej ekspozycji komórek na kadm), ale również obniżenie aktywności enzymów cyklu glutationowego – GSHPx (cał. GSHx i Se-GSHPx) i GST (tab. 1), które są odpowiedzialne za unieczynnianie nadtlenu wodoru, nadtlenu organicznych czy endo- i egzogennych związków elektrofilowych (12).

O stresie oksydacyjnym w hepatocytach poddanych działaniu kadmu świadczy również wzrost aktywności GSHR – enzymu odpowiedzialnego za odtwarzanie z GSSG zredukowanej formy glutationu (GSH).

W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że mechanizm toksycznego działania kadmu w hepatocytach związany jest nie tylko z indukcją peroksydacji lipidów, ale również ze zdolnością kadmu wiązania grup -SH obecnych w GSH i wypieraniem z centrum aktywnego lub z grupy prostetycznej Se czy Fe.

GSH pełni w hepatocytach rolę ochronną, ponieważ wiążąc kadm zmniejsza narażenie komórek na cytotoksyczne działanie tego metalu. Wiadomo, że w warunkach fizjologicznych GSH działa jako komórkowy „bufor tiolowy”, który bardzo skutecznie przeciwdziała efektom utleniania grup -SH. Zapobiega to utracie aktywności biologicznej wielu funkcjonalnych białek komórkowych. Potwierdzeniem tego jest obniżenie stężenia GSH i podobny charakter zmian aktywności katalazy i Se-GSHPx w hepatocytach narażonych przez 2 godziny na kadm w najwyższym stosowanym stężeniu (200 μM). Kadm, wiążąc się z GSH, obniża jego ilość w hepatocytach, co upośledza w nich reakcje ka-

talizowane przez enzymy cyklu glutationowego redox, w których GSH uczestniczy jako kosubstrat. Zmniejszenie stężenia GSH w komórkach prowadzi do peroksydacji lipidów i białek (12, 19, 24, 26).

Kadm, wypierając i zastępując inne metale w metaloenzymach, może wpływać na ich aktywność, czego konsekwencją mogą być zmiany w metabolizmie białek, kwasów nukleinowych, węglowodanów i lipidów.

Niezależnie od mechanizmu, w którym kadm bezpośrednio lub pośrednio indukuje stres oksydacyjny w hepatocytach, prowadzi to do zmian w strukturze ważnych biologicznie makrocząsteczek (białkach, lipidach, DNA i innych), a w efekcie do nieodwracalnych uszkodzeń i zaburzeń ich biologicznych funkcji. Peroksydacja lipidów powoduje nie tylko utratę integralności błon komórkowych hepatocytów, ale również narusza gradient jonowy oraz modyfikuje działanie wielu białek błonowych (np. enzymów, receptorów, kanałów i innych) (2). Stres oksydacyjny indukowany w hepatocytach przez kadm może się nasilać w wyniku osłabienia zdolności redukcyjnych komórek na skutek hamowania przez ten metal aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Hamując aktywność wymienionych enzymów kadm może pośrednio uczestniczyć w oksydacyjnym uszkodzeniu białek, lipidów czy DNA. Toksyczne działanie kadmu może się również wiązać z zaburzeniem szlaków sygnalizacyjnych i indukcją apoptozy w hepatocytach narażonych na kadm (22, 24). Zdolność kadmu do indukcji stresu oksydacyjnego, który powoduje oksydacyjne uszkodzenia DNA tłumaczy udział tego metalu w powstawaniu u ludzi nowotworów płuc, prostaty, trzustki i innych (29, 30).

Podsumowanie

Uzyskane w badaniach wyniki wskazują, że toksyczne działanie kadmu wynika z osłabienia mechanizmów antyoksydacyjnych w izolowanych hepatocytach szczura, czego konsekwencją są w nich zmiany stężenia GSH i podwyższony poziom peroksydacji lipidów mierzony ilością TBARS. O wpływie kadmu na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach świadczy również wzrost aktywności izoenzymów SOD (SOD1 i SOD2), biorących udział w eliminacji anionorodnika ponadtlenu – prekursora wszystkich rodników tlenowych i ich reaktywnych pochodnych. Kadm powoduje spadek aktywności GSHPx i GST odpowiedzialnych za unieczynnianie nadtlenu wodoru i nadtlenu lipidowych oraz tworzenie S-koniugatów z endogennymi i egzogennymi związkami elektrofilowymi, co prowadzi do ich inaktywacji i obniżenia toksyczności. Metal ten zwiększa wyraźnie aktywność GSHR – enzymu, który odtwarza w komórkach z GSSG pulę zredukowanego GSH. Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych i stężeń TBARS i GSH w komórkach wątroby szczura wywołane działaniem kadmu *in vitro* zależą zarówno od jego stężenia, jak i od czasu ekspozycji komórek na działanie tego metalu.

Zwiększenie poziomu peroksydacji lipidów oraz towarzyszące im zmiany stężenia GSH i aktywności enzymów antyoksydacyjnych (szczególnie cyklu glutationowego) w izolowanych hepatocytach szczura wywołane działaniem kadmu, świadczą o zaburzeniu w komórkach równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej.

Piśmiennictwo

1. *Anon.*: International Agency for Research on Cancer (IARC): Beryllium, cadmium, mercury, and exposure in the glass manufacturing industry. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. IARC Scientific Publications, Lyon 1993, 58, 119-237.
2. *Bartosz G.*: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa 2004.
3. *Beauchamp C., Fridovich I.*: Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971, 44, 276-287.
4. *Bradford M.*: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
5. *Brzóska M. M., Moniuszko-Jakoniuk J.*: The influence of calcium content in the diet on accumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Arch. Toxicol.* 1998, 72, 63-73.
6. *Casalino E., Calzaretti G., Sblano C., Landriscina C.*: Molecular inhibitory mechanism of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 2002, 179, 37-50.
7. *Ellman G. L.*: SH groups determination in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1970, 46, 237-243.
8. *Fariss M. W.*: Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes. *Toxicology* 1991, 69, 63-77.
9. *Golberg D. M., Spooner R. J.*: Glutathione reductase, [w:] Bregmayer H. V.: *Methods Enzymatic Analysis.* Verlag Chemie, Weinheim 1983, 3, 258-265.
10. *Goth L.*: A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta* 1999, 196, 143-151.
11. *Habig W. H., Pabst M., Jacoby W.*: Glutathione S-transferase, the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 7130-7139.
12. *Hayes J. D., McLellan L. I.*: Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1999, 31, 273-300.
13. *Järup L., Berglund M., Elinder C. G., Nordberg G., Vahter M.*: Health effects of cadmium exposure: a review of the literature and risk estimate. *Scand. J. Work Environ. Health* 1998, 24, 1-51.
14. *Jurczuk M., Brzóska M. M., Moniuszko-Jakoniuk J., Galażyn-Sidorczuk M., Kulikowska-Karpińska E.*: Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem. Toxicol.* 2004, 42, 429-438.
15. *Kolacz R., Dobrzański Z., Bodak E.*: Biokumulacja Cd, Pb i Hg w tkankach zwierząt. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 686-691.
16. *Oberley L. W., Spitz D. R.*: Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 1984, 105, 457-464.
17. *Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.*: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979, 25, 192-205.
18. *Paglia D., Valentine W.*: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967, 70, 158-168.
19. *Pastore A., Fedrici E., Bertini F., Piemonte S.*: Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 2003, 33, 19-39.
20. *Pourahmad J., O'Brien P. J.*: A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu⁺² and Cd⁺². *Toxicology* 2000, 143, 263-273.
21. *Pourahmad J., O'Brien P. J., Jokar F., Daraei B.*: Carcinogenic metal induces reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicol. Vitro* 2003, 17, 803-810.
22. *Robertson J. D., Orrenius S.*: Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 2000, 30, 609-627.
23. *Sedlak J., Lindsay R. H.*: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968, 25, 192-205.
24. *Sen C. K.*: Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell Regul.* 2000, 36, 1-30.
25. *Shaikh Z. A., Vu T., Zaman K.*: Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999, 154, 256-253.
26. *Sies H.*: Glutathione and its cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 27, 916-921.
27. *Stohs S. J., Bagchi D., Hassoun E., Bagchi M.*: Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2001, 20, 77-88.
28. *Tennant R. J.*: Evaluation of trypan blue techniques for determination of cell viability. *Transplantation* 1964, 2, 685-694.
29. *Waalkes M. P.*: Cadmium carcinogenesis. *Mut. Res.* 2003, 533, 107-120.
30. *Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D.*: Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003, 192, 95-117.
31. *Wang Y., Fang J., Leonard S., Rao K. M. K.*: Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Rad. Biol. Med.* 2004, 11, 1434-1443.
32. *Wendel A.*: Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981, 77, 325-333.

Adres autora: dr hab. Hanna Czczot, prof. WUM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: hanna.czczot@wp.pl