

УДК 636.92:661.875

Р. Я. Искра

*Институт біології тварин НААН, м. Львів*

### **АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ТА АЗОТИСТИЙ ОБМІН У КРОВІ КРОЛИКІВ ЗА ДІЇ ХЛОРИДУ ХРОМУ**

Досліджували вплив додавання до раціону кроликів хлориду хрому ( $Cr^{3+}$ , 200 мкг/кг комбі-корму) на стан системи антиоксидантного захисту та активність амінотрансфераз крові. За дії хрому в крові тварин підвищується активність каталази, глутатіонпероксидази та зростає вміст відновленого глутатіону. У крові кроликів дослідної групи активність аспартатамінотрансферази більша, порівняно з активністю ензиму у тварин контрольної групи.

Р. Я. Искра

*Институт биологии животных НААН, г. Львов*

### **АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА И АЗОТИСТЫЙ ОБМЕН В КРОВИ КРОЛИКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХЛОРИДА ХРОМА**

Исследовали влияние добавления в рацион кроликов хлорида хрома ( $Cr^{3+}$ , 200 мкг/кг комби-корма) на состояние системы антиоксидантной защиты и активность аминотрансфераз крови. При действии хрома в крови животных повышается активность каталазы, глутатионпероксидазы и растет содержание восстановленного глутатиона. В крови кроликов опытной группы активность аспартатаминотрансферазы большая, по сравнению с активностью фермента у животных контрольной группы.

R. Y. Iskra

*Institute of Animal Biology NAAS, Lviv*

### **ANTIOXIDANT SYSTEM AND NITROGEN METABOLISM IN RABBITS' BLOOD UNDER ACTION OF CHROMIUM CHLORIDE**

The effect of chromium chloride ( $Cr^{3+}$ , 200  $\mu$ g/kg of the combined feed) on the state of rabbits antioxidant system and amino transferases activity was studied. It was found that chromium entailed the increase of activity of catalase, glutathione peroxidase and the content of reduced glutathione in the animals' blood. It was established that the activity of aspartate amino transferase in the exposed rabbits' blood is greater than in the animals of control group.

#### **Вступ**

Хром ( $Cr^{3+}$ ) – один із маловивчених мінеральних елементів, який відіграє важливу роль у процесах життєдіяльності людей і тварин, нормальному вуглеводному, ліпідному та білковому обміні [11]. Цей мікроелемент біологічно активний у складі олігопептиду хромодуліну, який активує дію інсуліну шляхом сприяння зв'язуванню гормона з рецепторами на поверхні клітини. За недостатнього надходження цього мікроелемента в організмі виникають метаболічні порушення, симптоми яких подібні до таких, що спостерігаються при діабеті та серцево-судинних хворобах. Високі дози

хрому можуть виявляти антидіабетичну та анаболічну дію [4]. Крім цього, тривалентний хром не проявляє генотоксичного ефекту, проте має антиоксидантну та антиапоптотичну дію [5]. Разом із цим, у літературі зустрічаються суперечливі дані щодо дії хрому на систему антиоксидантного захисту та механізмів цього впливу. Є дані, що  $Cr^{3+}$  може виступати як антиоксидант і прооксидант [16]. Цей ефект пояснюється здатністю іонів хрому брати участь в окисно-відновних реакціях у зв'язку з віддачею чи прийманням електронів.

Крім цього,  $Cr^{3+}$  активує ензими, стабілізує білки та нуклеїнові кислоти, сприяє росту та регенерації тканин, підвищує імунітет і стимулює кровотворення [16]. При додаванні  $Cr^{3+}$  до раціону щурів збільшується вміст амінокислот у тканинах, посилюється їх включення в білки тканини серця [13]. В експериментах *in vitro* встановлено, що  $Cr^{3+}$  збільшує синтез РНК у клітинах печінки мишей [8]. Це підтверджує, що  $Cr^{3+}$  має вплив на експресію генів. Зв'язуючись із хроматином, він викликає збільшення ініціювання локусів і, отже, інтенсифікацію синтезу РНК. Дія  $Cr^{3+}$  пов'язана з індукцією синтезу білка в ядрі та ядерною активацією хроматину [8].

Для тварин використовують корми, які містять достатню кількість хрому. Проте незначне засвоєння його з природних кормів, інтенсивний ріст тварин, який викликає дефіцит мікроелемента в організмі та вплив стресу на виділення  $Cr^{3+}$  з організму зумовлюють необхідність уведення сполук хрому до раціону тварин.

Тому мета цієї роботи – з'ясувати метаболічний вплив хлориду хрому на стан системи антиоксидантного захисту та інтенсивність азотистого обміну в крові кроликів.

### Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено на 10 кроликах породи «Сірий велетень» у кролівничому господарстві с. Демня Миколаївського району Львівської області. Кроликів поділили на дві групи: контрольну та дослідну (по 5 тварин, підібраних за принципом аналогів). Молодняку кроликів контрольної (К) групи згодовували стандартний гранульований комбікорм К-92-1, дослідної (Д) групи – цей самий комбікорм з уведенням у раціон із 20-ї доби життя добавки хрому – 200 мкг/кг маси комбікорму  $Cr^{3+}$  (у вигляді  $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ ). Враховуючи живу масу кроленят (500 г) і кількість спожитого ними за добу корму (20 г), доза хрому на початку дослідження становила – 8 мкг/кг маси тіла. Доступ до кормів і води для кроликів був необмежений. Тривалість дослідження становила 135 діб, у т. ч. підготовчий період 20 діб, дослідний – 115 діб. На 135-ту добу життя у кроленят для біохімічних досліджень відбирали зразки крові з крайової вухної вени.

У крові визначали вміст гідропероксидів методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою з наступним унесенням у середовище тіоціанату амонію; концентрацію ТБК-активних продуктів вимірювали за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою; активність супероксиддисмутази визначали методом, принцип якого полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами; активність глутатіонпероксидази – за швидкістю окиснення відновленого глутатіону; каталази – на основі здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий кольоровий комплекс; глутатіонредуктази – за швидкістю відновлення глутатіону за присутності NADPH; вміст відновленого глутатіону – за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою; вміст вітамінів А і Е – за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії на хроматографі «Міліхром-4» («Научприбор», Росія), активність амінотрансфераз – на біохімічному аналізаторі «Humalizer-2000» [3]. Одержані цифрові дані обробляли ста-

тистично. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

### Результати та їх обговорення

У результаті додавання до корму кроликів хлориду хрому вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у їх крові вірогідно не змінювався, проте спостерігалася тенденція до зниження рівня гідроперекисів ліпідів і зростання ТБК-активних продуктів (табл.). Продукти перекисного окиснення деформують мембрани клітин, порушують їх осмотичну резистентність і електричний потенціал, окислюють тіолові сполуки і SH-групи білків мембран. Динаміка утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів контролюється системою антиоксидантного захисту, яка не тільки запобігає розвитку вільнорадикальних реакцій, утворенню супероксид-аніона та пероксидів, а й підтримує високу активність окисно-відновних процесів, забезпечує елімінацію кінцевих кисневих метаболітів із залученням їх до енергетичного обміну та активації процесів синтезу.

Активність ензиму антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази), який катаболізує супероксид-аніон, у крові кроликів дослідної групи вірогідно не змінювалася, проте спостерігалася тенденція до її зниження. В еритроцитах у більшій мірі міститься  $Fe^{2+}$ -залежна супероксиддисмутаза [1], тому, враховуючи, що  $Cr^{3+}$  є антагоністом  $Fe^{2+}$ , він здатний витіснити катіон  $Fe^{2+}$  з активного центру ензиму, знижуючи його активність.

Таблиця

Деякі метаболічні показники крові кроликів за дії хлориду хрому ( $M \pm m, n = 5$ )

Показники	Групи тварин	
	контрольна	дослідна
Гідроперекиси ліпідів, ум. од/г протеїну	0,32 ± 0,04	0,30 ± 0,01
ТБК-активні продукти, нмоль / г протеїну	2,55 ± 0,09	2,75 ± 0,11
Супероксиддисмутаза, умов. од.	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Каталаза, мкмоль/хв на 1 мг протеїну	3,68 ± 0,08	3,89 ± 0,02*
Глутатіонпероксидаза, нмоль/хв на 1 мг протеїну	61,10 ± 1,16	68,15 ± 2,54*
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв на 1 мг протеїну	0,82 ± 0,04	0,88 ± 0,02
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	0,55 ± 0,05	0,91 ± 0,03***
Вітамін Е, мг/мл	4,39 ± 0,29	4,52 ± 0,36
Вітамін А, мг/мл	0,75 ± 0,02	0,78 ± 0,02
АлАТ, мкмоль/год х мл	0,37 ± 0,03	0,40 ± 0,01
АсАТ, мкмоль/ год х мл	0,35 ± 0,02	0,46 ± 0,02**

**Примітки:** вірогідні різниці показників дослідної групи порівняно з контрольною: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

За дії хлориду хрому у крові кроликів зростала активність ензимів, які каталізують реакції деградації пероксиду водню та гідроперекисів (каталази та глутатіонпероксидази). Активність каталази вірогідно зростала на 5,7 %, а глутатіонпероксидази – на 11,5 %. Отримані результати узгоджуються з літературними даними, де в людей, хворих на цукровий діабет, активність глутатіонпероксидази збільшувалася за умов додавання до їх раціону  $Cr^{3+}$  та  $Cr^{3+}$  у комплексі з вітамінами С і Е [7].

Активнація глутатіонпероксидази в крові тварин дослідної групи можлива лише за умови підтримання достатньо високого рівня внутрішньоклітинного відновленого глутатіону, що підтверджено у наших дослідженнях. Відновлений глутатіон виконує роль не лише субстрату реакцій, а і чинника, необхідного для постійного відновлення розміщених у каталітичному центрі ензиму селенольних груп, що окиснюються у процесі глутатіонпероксидазної реакції [2]. За дії хлориду хрому виявлено зростання

вмісту відновленого глутатіону в крові кроликів (на 64,5 %), що свідчить про суттєвий вплив хлориду хрому на синтез відновленого глутатіону. Відновлений глутатіон бере участь в утилізації пероксиду водню та органічних пероксидів [9], а також у кон'югації цитотоксичних карбонільних продуктів метаболізму [15]. Існують відомості про те, що зміна рівня глутатіону виступає чутливим маркером оксидативного стресу [14].

Активність глутатіонредуктази (ензиму, відповідального за поповнення внутрішньоклітинного пулу відновленого глутатіону) має тенденцію до зростання в крові за дії сполуки хрому (див. табл.). Глутатіонредуктаза є залежним від NADPH ензимом, активність якого підвищується у разі накопичення відновленої форми нуклеотиду [2], одного з продуктів дегідрогеназних реакцій пентозофосфатного шляху окиснення глюкози. Таким чином, реалізується метаболічний зв'язок між енергетичними процесами та функціональною здатністю антиоксидантної системи в крові.

Отримані результати досліджень узгоджуються з даними літератури про те, що  $Cr^{3+}$  виявляє регуляторний вплив на експресію генів антиоксидантних ензимів [5].

За дії хлориду хрому у крові кроликів дослідної групи спостерігається невірогідне підвищення вмісту вітамінів *A* та *E* (див. табл.). Вітамін *A* та його природний попередник  $\beta$ -каротин захищають мембрани клітин від руйнівної дії вільних радикалів, за цих умов  $\beta$ -каротин нейтралізує найнебезпечніші види вільних радикалів: поліненасичені та кисневі [12]. Вітамін *A* і  $\beta$ -каротин – сильні антиоксиданти, за допомогою яких здійснюють профілактику та лікування ракових захворювань, попереджають повторну появу пухлин після операції.

Вітамін *E* (токоферол) також має антиоксидантну дію за рахунок інгібування окиснення ліпідів мембран. Токофероли, вбудовуючись боковими ланцюгами між поліненасиченими жирними кислотами фосфоліпідів клітинних мембран, за рахунок взаємодії подвійних зв'язків утворюють комплекси, збільшуючи щільність упаковки у фосфоліпідному бішарі, тим самим запобігають проникненню кисню та утворенню пероксидних радикалів [17]. Це, у свою чергу, викликає зменшення загальної швидкості окиснення та стабілізації процесу перекисного окиснення ліпідів, відповідний рівень якого необхідний для фізіологічного перебігу багатьох біохімічних процесів, зокрема, індукції апоптозу та формування клітинного імунітету [17].

Азотистий обмін в організмі кроликів характеризують амінотрансферази крові. Активність амінотрансфераз у крові тварин – важливий біохімічний тест для оцінки стану паренхіматозних органів, зокрема печінки. Різне підвищення активності цих ензимів спостерігається при токсичних станах організму внаслідок посиленого вивільнення амінотрансфераз у кров'яне русло з пошкоджених клітин [10].

Рівень аланінамінотрансферази – ензиму, що каталізує обернене перенесення аміногруп з аланіну на  $\alpha$ -кетоглутарову кислоту з утворенням пірувату, невірогідно зростає в крові тварин дослідної групи порівняно з контролем.

Подібна закономірність характерна для аспаратамінотрансферази – ензиму, що каталізує обернене перенесення аміногрупи з аспартату на  $\alpha$ -кетоглутарову кислоту з утворенням оксал-ацетату, активність якого вірогідно зростає в крові тварин дослідної групи (на 32,5 %). Підвищення активності ензиму свідчить про незначний вихід цих ензимних білків у кров через ушкоджені клітинні мембрани, в основному, кардіоміоцитів. Проте таке зростання активності аспаратамінотрансферази у крові тварин не виходить за фізіологічні норми.

## Висновки

Уведення до раціону кроликів добавки хлориду хрому в кількості 200 мкг/кг  $Cr^{3+}$  маси комбікорму викликає активацію системи антиоксидантного захисту організму: підвищення активності каталази, глутатіонпероксидази та зростання вмісту відновленого глутатіону. Очевидно, це зумовлено стимуляцією хромом експресії генів ензимів антиоксидантного захисту та збільшенням їх активності. За дії хлориду хрому у крові кроликів зростає активність аспаратамінотрансферази, що свідчить про незначний вихід цих ензимних білків у кров через ушкоджені клітинні мембрани тканин організму.

## Бібліографічні посилання

1. **Беленічев І. Ф.** Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І. Ф. Беленічев, Є. Л. Левицький, Ю. І. Губський // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 3. – С. 24–29.
2. **Кулинский В. И.** Биологическая роль глутатиона / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Усп. совр. биол. – 1993. – Т. 113. – С. 107–121.
3. **Фізіолого-біохімічні** методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. А. Макар та ін. – Львів : BMC, 2004. – 399 с.
4. **Cefalu W. T.** Role of chromium in human health and in diabetes / W. T. Cefalu, F. B. Hu // Diabetes Care. – 2004. – Vol. 27, N 11. – P. 2741–2751.
5. **Chromium** attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis / W. Y. Chen, C. C. Jung, L. J. Wang et al. // Life Sciences. – 2009. – Vol. 84. – P. 606–614.
6. **Dickinson D. A.** Cellular glutathione and thiols metabolism / D. A. Dickinson, H. J. Forman // Biochem. Pharmacol. – 2002. – Vol. 64. – P. 1019–1026.
7. **Lai M.-H.** Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and E supplementation for type 2 diabetes mellitus // Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. – 2008. – Vol. 43, N 3. – P. 191–198.
8. **Okada S.** Effect of chromium (III) on nuclear RNA-synthesis / S. Okada, H. Tsukada, M. Tezuka // Biological Trace Element Research. – 1989. – Vol. 21. – P. 35–39.
9. **Okada S.** Enhancement of ribonucleic acid synthesis by chromium (III) in mouse liver / S. Okada, M. Susuki, H. Ohba // Journal of Inorganic Biochemistry. – 1983. – Vol. 19. – P. 95–103.
10. **Park G. J.** Aspartate aminotransferase: Alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: Is it a useful predictor of cirrhosi / G. J. Park, B. P. Lin, M. C. Ngu et al. // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2000. – Vol. 15, N 4. – P. 386–390.
11. **Pechova A.** Chromium as an essential nutrient: A review / A. Pechova, L. Pavlata // Veterinarni Medicina. – 2007. – Vol. 52, N 1. – С. 1–18.
12. **Reduced** levels of rat lens antioxidant vitamins upon *in vitro* UVB irradiation / G. B. Reddy, S. Nayak, P. Y. Reddy et al. // The Journal of Nutritional Biochemistry. – 2001. – Vol. 12, is. 2. – P. 121–124.
13. **Roginski E. F.** Effects of chromium (III) supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low protein diet / E. F. Roginski, W. Mertz // Journal of Nutrition. – 1969. – Vol. 97. – P. 525–530.
14. **Sahin E.** Stress dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidants in peripheral tissues of rats: Comparison of three stress models / E. Sahin, S. Gumuslu // Exp. Pharmacol. Physiol. – 2007. – Vol. 34, N 5–6. – P. 425–431.
15. **Two** distinct 4-hydroxynonenal metabolizing glutathione S-transferase isozymes are differentially expressed in human tissues / J. Z. Cheng, Y. Yang, S. P. Singh et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – Vol. 282, N 5. – P. 1268–1274.
16. **Vincent J. B.** The Nutritional Biochemistry of Chromium (III). – The University of Alabama Tuscaloosa, USA, 2007. – 277 p.
17. **Wang X.** The location and function of vitamin E in membranes / X. Wang, P. J. Quinn // Mol. Memb. Biol. – 2000. – Vol. 17, N 3. – P. 143–156.

Надійшла до редколегії 27.05.2012