

*Hanna Czczot, Michał Skrzycki, Monika Majewska, Małgorzata Podsiad,
Wojciech Karlik¹⁾, Danuta Grono¹⁾, Maria Wiechetek¹⁾*

ZMIANY AKTYWNOŚCI ENZYMÓW GSH-ZALEŻNYCH W IZOLOWANYCH HEPATOCYTACH SZCZURA PODDANYCH DZIAŁANIU KADMU*)

Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. *A. Barańczyk-Kuźma*

¹⁾ Zakład Farmakologii i Toksykologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny
Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Wiechetek*

Badano wpływ kadmu na aktywność enzymów GSH-zależnych w izolowanych hepatocytach szczura. Oznaczone aktywności peroksydazy glutationowej (GS-HPx), transferazy glutationowej (GST), reduktazy glutationowej (GSHR), stężenie zredukowanego glutationu (GSH) oraz poziom peroksydacji lipidów mierzonej ilością TBARS w hepatocytach poddanych działaniu kadmu wskazują, że związek ten osłabia w nich antyoksydacyjne mechanizmy obronne.

Hasła kluczowe: kadm, izolowane hepatocyty szczura, stres oksydacyjny, peroksydacja lipidów (TBARS), zredukowany glutation (GSH), enzymy GSH-zależne.
Key words: cadmium, isolated rat hepatocytes, oxidative stress, lipid peroxidation (TBARS), reduced glutathione (GSH), enzymes GSH-dependent.

Kadm (Cd^{+2}) jest pierwiastkiem powszechnie występującym w środowisku. Jest on obecny w glebie, wodzie i powietrzu oraz w tkankach roślin i zwierząt (1, 2). Od wielu lat kadm znajduje się na liście głównych zanieczyszczeń środowiska stanowiących istotne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. W 1993 r. został uznany przez Międzynarodową Agencję do Walki z Rakiem (IARC) za czynnik środowiskowy o działaniu rakotwórczym dla ludzi (kategoria A1) (3, 4, 5). Narządami szczególnie narażonymi na działanie kadmu są nerki i wątroba (1, 2, 6). Wykazuje on nie tylko działanie nefrotoksyczne, hepatotoksyczne i neurotoksyczne, ale również działanie mutagenne i kancerogenne (4, 5, 7).

Wielokierunkowy charakter toksycznego działania kadmu na organizm wydaje się być uwarunkowany działaniem różnych mechanizmów. Kadm wypiera cynk, miedź z kompleksów z metalotioneiną, selen, żelazo i wapń z metaloenzymów. Tworzy różnego typu wiązania chemiczne z reaktywnymi grupami funkcyjnymi

*) Praca została wykonana w ramach tematów projektów badawczych WUM: 1WK/N/09 oraz 1WK/W1/09.

Autorzy dziękują za pomoc techniczną Pani *E. Mętrak*.

(np. – SH, –OH, –COOH, NH₂) ważnych biologicznie makrocząsteczek, co może zaburzać w komórkach stan redoks i prowadzić do stresu oksydacyjnego (1, 8, 9, 10, 11, 12).

Ważną rolę w ochronie komórek przed toksycznym działaniem wielu metali pełni zredukowany glutation (GSH) i współdziałające z nim enzymy GSH-zależne, do których zaliczamy: peroksydazę (GSHPx), transferazę (GST) oraz reduktazę glutationową (GSHR). GSH ma zdolność chelatowania metali. Jest bardzo efektywnym zmiataczem wolnych rodników (WR) i reaktywnych form tlenu (RFT), a także substratem w reakcjach sprzęgania, prowadzących do detoksykacji wielu elektrofilowych endo- i egzogennych związków. Uczestniczy w reakcjach katalizowanych przez enzymy GSH-zależne (13, 14, 15, 16, 17).

Peroksydaza glutationowa (GSHPx) katalizuje redukcję nadtlenu wodoru oraz nadtlenu organicznych przy udziale zredukowanego glutationu (GSH). Selenozależna peroksydaza glutationowa (SeGSHPx) unieczynnia przede wszystkim H₂O₂, natomiast całkowita GSHPx (cał. GSHPx) unieczynnia głównie nadtlenuki organiczne, powstające w komórce w wyniku peroksydacji lipidów. Transferaza S-glutationowa (GST) neutralizuje reaktywne formy tlenu, a także endo- i egzogenne związki o działaniu mutagennym i kancerogennym. Enzym ten katalizuje ich koniugację z glutationem. Enzymem wspomagającym działanie GSHPx i GST jest reduktaza glutationowa (GSHR), która w obecności NADPH katalizuje redukcję utlenionego glutationu (GSSG) do jego formy zredukowanej (2 GSH) (9, 13, 14, 15).

Ponieważ jeden z wielu proponowanych mechanizmów toksycznego działania kadmu zakłada jego udział w indukcji stresu oksydacyjnego, podjęto badania mające na celu określenie wpływu tego metalu na antyoksydacyjne mechanizmy obronne w układzie *in vitro*, ze szczególnym zwróceniem uwagi na aktywność enzymów GSH-zależnych.

Dla realizacji badań wykorzystano izolowane hepatocyty szczura – uznany powszechnie alternatywny model badawczy *in vitro* do badania metabolizmu ksenobiotyków.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki chemiczne: Antybiotyki (penicylina G, streptomycyna i amfoterycyna B), 0,4% roztwór błękitu trepanu (TB), dimetylosulfotlenek (DMSO), kolagenaza typ IV, Williams'E Medium (WE), płodowa surowica bydlęca (FBS-fetal bovine serum), chlorek kadmu pochodzący z firmy Sigma Chemicals Co (ST. Luis, MO, USA).

Odczynniki użyte w badaniach biochemicznych pochodziły z następujących źródeł: kwas 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzenowy (DTNB), zredukowany glutation (GSH), utleniony glutation (GSSG), kwas tiobarbiturowy, kwas sulfosalicylowy, nadtlenuk wodoru, nadtlenuk kumenu, reduktaza glutationowa, Tris base z firmy Sigma; NADPH z firmy MP Biomedicals, LCC.

Wszystkie sole nieorganiczne i pozostałe odczynniki wykorzystane w doświadczeniach pochodziły z firmy POCH (Polskie Odczynniki Chemiczne) Gliwice (Polska).

Zwierzęta. 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.

Na wykonanie badań uzyskano zgodę III Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW w Warszawie (Nr 16/ 2006).

Izolowanie i inkubacja hepatocytów z chlorkiem kadmu (CdCl_2). 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 przekraczała 85% (18).

Izolowane hepatocyty (1×10^6 żywych komórek/ cm^3) inkubowano 0, 1 i 2 godz. w modyfikowanym (pozbawionym fosforanów i węglanów) medium *Williams' E* (MWE) o pH 7,35 w obecności chlorku kadmu w stęż.: 25, 50 i 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

Inkubację hepatocytów z chlorkiem kadmu przeprowadzano w kolbkach Erlenmayera w łaźni wodnej (Hermle – Labortechnik, Niemcy) o temp. 38°C, ze stałym wytrząsaniem (100 cykli/min.). Podczas inkubacji, zawiesinę hepatocytów wysycano karbogenem (5% CO_2 + 95% O_2).

Próbki do analiz pobierano w momencie rozpoczęcia (układ kontrolny) oraz po 1 i 2 godz. inkubacji i odwirowano ($900 \times \text{g}$) przez 10 min. Otrzymane po wirowaniu hepatocytów supernatanty użyto do dalszych oznaczeń. Wykonano 3 oddzielne doświadczenia.

Izolowanie, inkubację hepatocytów z chlorkiem kadmu oraz przygotowanie supernatantów przeprowadzono w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii SGGW.

Oznaczenia biochemiczne. W supernatantach otrzymanych z izolowanych hepatocytów inkubowanych 1 i 2 godz. z kadmem oznaczono aktywność enzymów antyoksydacyjnych: całkowitej peroksydazy glutationowej (cał. GSHPx), selenozależnej peroksydazy glutationowej (SeGSHPx), transferazy-S-glutationowej (GST) i reduktazy glutationowej (GSHR) oraz poziom peroksydacji lipidów mierzony ilością TBARS i stężenie zredukowanego glutationu (GSH). Ponadto w supernatantach oznaczano stężenie białka całkowitego. Wszystkie powyższe oznaczenia wykonano na Katedrze i Zakładzie Biochemii WUM.

Aktywność enzymów GSH-zależnych

Aktywność cał. GSHPx (EC 1.11.1.9) oznaczano wg metody *Wendel* (19). W metodzie tej GSHPx katalizuje utlenianie GSH przy udziale nadtlenu kumenu. Jedna jednostka aktywności peroksydazy katalizuje utlenienie przez nadtlenek kumenu 1 μmol GSH w czasie 1 min. przy pH 7,0 i w temp. 37°C.

Aktywność SeGSHPx (EC 1.11.1.9) oznaczano na podstawie metody opisanej przez *Wendel* (19) oraz *Paglia* i *Valentine* (20). W metodzie tej SeGSHPx katalizuje utlenianie GSH przy udziale nadtlenu wodoru. Za jednostkę aktywności SeGSHPx przyjęto taką ilość enzymu która katalizuje przekształcenie 1 μmola zredukowanego GSH do jego formy utlenionej (GSSG) w czasie 1 min. przy pH 7,0 i w temp. 37°C.

Aktywność GST (EC 2.5.1.18) oznaczano wg metody *Habig* i współpr. (21), stosując jako substrat 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB). Jedna jednostka aktywności

GST odpowiadała takiej ilości enzymu, która katalizowała przekształcenie 1 μ mola substratu w produkt w ciągu 1 min.

Aktywność GSHR (EC 1.6.4.2) oznaczano wg metody opisanej przez *Goldberg* i *Spooner* (22). Jako substratu użyto utlenionego glutationu (GSSG). Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która katalizuje przekształcenie 1 μ mola utlenionego glutationu (GSSG) do jego formy zredukowanej (GSH) w czasie 1 min. i w temp. 37°C.

Poziom peroksydacji lipidów (TBARS) oznaczano wg metody *Ohkawa* i współpr. (23). 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* (24) i *Sedlak* i *Lindsey* (25). Metoda ta oparta jest na tworzeniu barwnego produktu, który powstaje w reakcji GSH z kwasem 5,5'-ditiobis-nitrobenzenowym (DTNB).

Stężenie białka w supernatantach oznaczano zgodnie z metodą *Bradford* (26).

Pomiaru absorbancji we wszystkich oznaczeniach wykonywano za pomocą spektrofotometru Shimadzu UV 1202.

Aktywność badanych enzymów wyrażono w U/mg białka. Stężenie GSH i TBARS wyrażono odpowiednio w μ mol/mg białka i nmol/mg białka.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica 6.0 StatStof. Inc. (St Tulsa, USA). Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z trzech niezależnych doświadczeń \pm SD.

Istotność różnic oznaczono testem *t*-Studenta. Różnice między średnimi arytmetycznymi przyjęto za istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$.

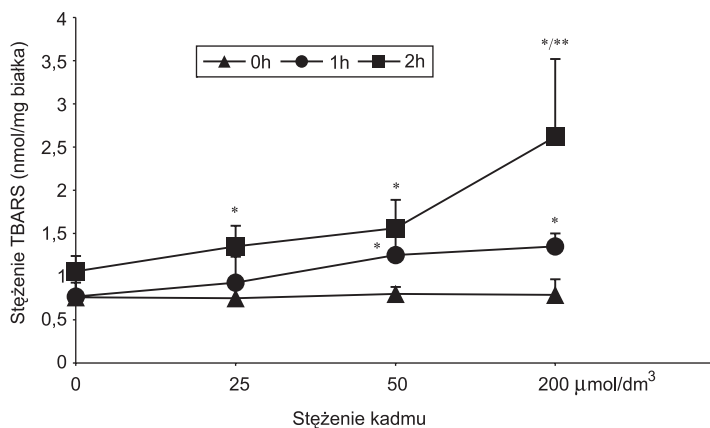
WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Otrzymane w pracy wyniki dotyczące wpływu kadmu na poziom peroksydacji lipidów mierzony ilością TBARS i stężenie GSH oraz aktywność GSH-zależnych enzymów przedstawiono graficznie na ryc. 1–3.

Poziom peroksydacji lipidów i stężenie GSH

Chlorek kadmu w stęż. 25, 50 i 200 μ mol/dm³ nasilał peroksydację lipidów w izolowanych hepatocytach szczura podczas jedno- i dwugodzinnej ich ekspozycji na działanie tego związku (ryc. 1). Stopień wzrostu stężenia TBARS zależał zarówno od czasu ekspozycji komórek na kadm, jak i od jego stężenia.

Już po godzinnej ekspozycji hepatocytów z kadmem w stęż. 50 i 200 μ mol/dm³ zaobserwowano w nich istotne podwyższenie poziomu peroksydacji lipidów w porównaniu do układu kontrolnego, który stanowiły hepatocyty w medium MWE zawierającym badane stężenia chlorku kadmu. Dłuższe (dwugodzinne) narażenie hepatocytów na chlorek kadmu doprowadzało do wyraźnego wzrostu stężenia TBARS w komórkach w porównaniu do układu kontrolnego i jednogodzinnej ekspozycji. Istotny statystycznie wzrost stężenia TBARS w porównaniu do układu kontrolnego



Ryc. 1. Wpływ chlorku kadmu na poziom peroksydacji lipidów w izolowanych hepatocytach szczura. Objasnienia: * – różnica statystycznie istotna w stosunku do układu kontrolnego ($p \leq 0,05$); ** – różnica statystycznie istotna w stosunku do 1 godz. ekspozycji hepatocytów szczura na chlorek kadmu ($p \leq 0,05$). Układ kontrolny stanowiły hepatocyty w medium MWE zawierające badane stężenia chlorku kadmu.

Fig. 1. Effect of cadmium chloride on lipid peroxidation level in isolated rat hepatocytes.

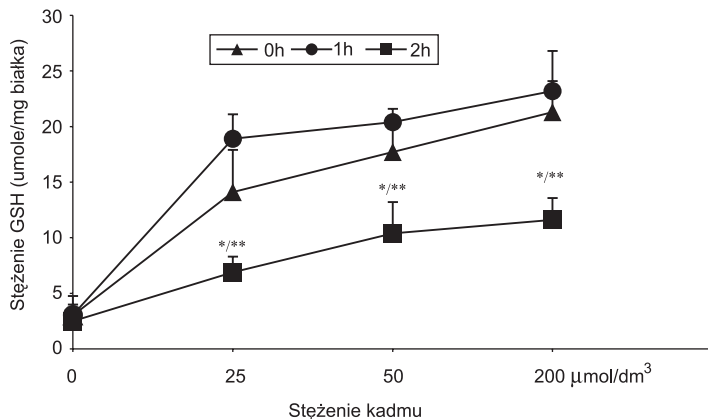
Abbreviations: * – significant versus control ($p \leq 0,05$); ** – significant versus isolated rat hepatocytes exposed to cadmium chloride for 1 h ($p \leq 0,05$). Hepatocytes in MWE containing tested concentration of cadmium chloride were used as the control.

stwierdzono w hepatocytach ekspozowanych 2 godz. na chlorek kadmu już w najniższym zastosowanym w doświadczeniu stężeniu ($25 \mu\text{mol/dm}^3$) (ryc. 1). Ekspozycja hepatocytów na kadm w tych samych warunkach, ale w wyższych stężeniach (50 i $200 \mu\text{mol/dm}^3$) doprowadzała do dalszego wzrostu poziomu peroksydacji lipidów. Najwyższy poziom peroksydacji lipidów mierzony ilością TBARS obserwowano w hepatocytach inkubowanych przez 2 godz. w obecności chlorku kadmu w stęż. $200 \mu\text{mol/dm}^3$ (ryc. 1). Podwyższenie poziomu peroksydacji lipidów w hepatocytach ekspozowanych 1 i 2 godz. i zaobserwowana zależność czas-dawka-efekt wskazują, że mechanizm toksycznego działania kadmu na hepatocyty szczura wiąże się z indukcją stresu oksydacyjnego. Niezależnie od mechanizmu, w którym kadm bezpośrednio lub pośrednio indukuje stres oksydacyjny w hepatocytach, prowadzi to do zmian w ich strukturze i metabolizmie oraz nieodwracalnych uszkodzeń komórek (27, 28). Peroksydacja lipidów prowadzi nie tylko do utraty czy zaniku integralności błon komórkowych hepatocytów, ale również narusza gradient jonowy oraz modyfikuje działanie bardzo wielu białek błonowych (np. enzymów, receptorów i innych) (3, 8).

Ekspozycja hepatocytów na działanie chlorku kadmu doprowadzała również do zmian w stężeniu zredukowanego glutationu (GSH) w komórkach (ryc. 2).

Nieznaczny wzrost stężenia GSH w porównaniu z układem kontrolnym stwierdzano w hepatocytach poddanych jednogodzinnej inkubacji z chlorkiem kadmu w stęż. 25 – $200 \mu\text{mol/dm}^3$. Natomiast dwugodzinna ekspozycja hepatocytów na chlorek kadmu w zakresie badanych stężeń doprowadzała do wyraźnego spadku ilości GSH (ryc. 2). Statystycznie istotny spadek stężenia GSH w porównaniu z układem kontrolnym i jednogodzinnym narażeniem komórek na ten metal zaobserwowano

już podczas inkubacji hepatocytów w obecności kadmu w najniższym stężeniu ($25 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Ekspozycja hepatocytów na kadm w wyższych stężeniach (50 i $200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) prowadziła do dalszego obniżenia ilości GSH.



Ryc. 2. Wpływ chlorku kadmu na stężenie zredukowanego glutatiomu (GSH) w izolowanych hepatocytach szczura.

Objaśnienia: jak na ryc.1.

Fig. 2. Effect of cadmium chloride on reduced glutathione (GSH) concentration in isolated rat hepatocytes.

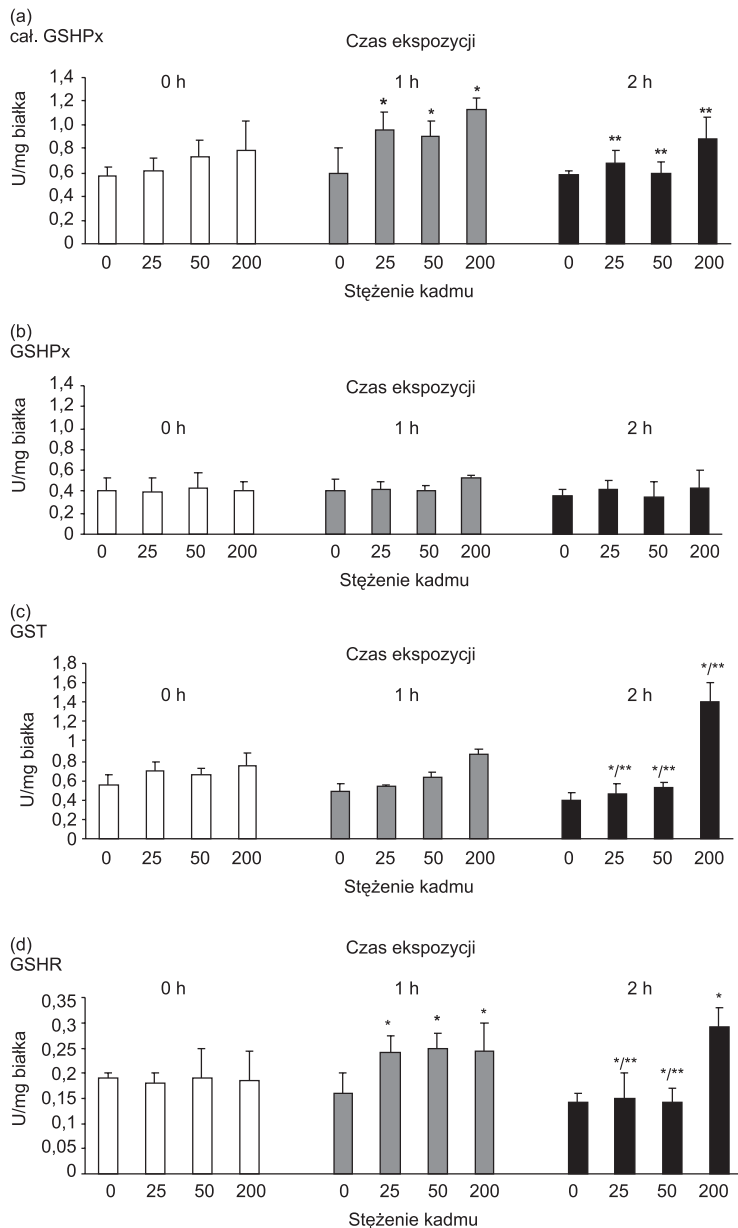
Abbreviations as in fig.1.

Rola GSH w komórkach wątroby nie ogranicza się tylko do usuwania z nich RFT powstających w wyniku działania kadmu (15, 19). Wyraźne obniżenie stężenia GSH, zwłaszcza po dłuższym czasie narażenia hepatocytów na działanie kadmu wskazuje, że pełni on również ochronną funkcję w zapobieganiu toksyczności tego metalu. GSH wiążąc kadm zmniejsza narażenie hepatocytów na toksyczne działanie tego związku. Następstwem czego jest niestety obniżenie stężenia GSH w hepatocytach, co upośledza w nich wiele ważnych procesów wewnątrzkomórkowych i prowadzi do osłabienia antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych (6, 16, 19, 23, 24).

Aktywność enzymów GSH-zależnych

Całkowita aktywność peroksydazy glutationowej (cał. GSHPx) w hepatocytach ekspozycyjnych przez 1 godzinę na chlorek kadmu w stęż. 25 , 50 i $200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ była istotnie wyższa w porównaniu z hepatocytami kontrolnymi. Natomiast w hepatocytach poddanych dwugodzinnej ekspozycji na kadm w zakresie badanych stężeń stwierdzono niższą aktywność tego enzymu od obserwowanej w układzie kontrolnym i po jednogodzinnym narażeniu. Zaobserwowane różnice były statystycznie istotne. Najwyższą aktywność cał. GSHPx stwierdzono w hepatocytach ekspozycyjnych przez 1 godz. na chlorek kadmu w stęż. $200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (ryc. 3 a).

Nie stwierdzono wyraźnych zmian aktywności SeGSHPx w hepatocytach narażonych na działanie kadmu w zależności od stężenia i czasu ekspozycji komórek na ten metal (ryc. 3b).



Ryc. 3 a, b, c i d. Aktywność cał. GSHPx (a) i SeGSHPx (b), GST (c) i GSHR (d) w izolowanych hepatocytach szczura poddanych działaniu chlorku kadmu w stęż. 25, 50 i 200 μmol/dm³.

Objaśnienia: jak na ryc. 1. cał. GSHPx – całkowita aktywność peroksydazy glutationowej; SeGSHPx – seleno-zależna peroksydaza glutationowa; GST – transferaza-S-glutationowa; GSHR – reduktaza glutationowa.

Fig. 3 a, b, c, d. Total activity of GSHPx (a), SeGSHPx (b), GST (c) and GSHR (d) in isolated rat hepatocytes exposed to cadmium chloride at 25, 50 and 200 μmol/dm³.

Abbreviations as fig.1; tot. GSHPx – total glutathione peroxidase; SeGSHPx – selenium-dependent glutathione peroxidase; GST – glutathione S-transferase; GSHR – glutathione reductase.

Aktywność GST w hepatocytach ekspozowanych 1 godz. na chlorek kadmu była na podobnym poziomie jak w hepatocytach kontrolnych. Po dwugodzinnej ekspozycji komórek na kadm w stęż. 25 i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ stwierdzono istotny spadek aktywności GST w porównaniu z układem kontrolnym i jednogodzinnym narażeniem. Dwugodzinne działanie kadmu na hepatocyty w najwyższym zastosowanym w doświadczeniu stężeniu (200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) doprowadzało do statystycznie istotnego wzrostu aktywności GST w porównaniu z układem kontrolnym (o 86%) i jednogodzinną ekspozycją (o 61%) (ryc. 3c).

W hepatocytach ekspozowanych przez 1 godz. na kadm istotne podwyższenie aktywności GSHR w porównaniu z układem kontrolnym stwierdzono dla wszystkich zastosowanych w doświadczeniu stężeń tego związku. Dwugodzinne narażenie komórek na działanie 25 i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ kadmu doprowadzało do wyraźnego obniżenia aktywności GSHR. Natomiast znamieny wzrost aktywności GSHR w porównaniu z układem kontrolnym i krótszym czasem ekspozycji stwierdzono w komórkach ekspozowanych na kadm w stężeniu najwyższym (200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) (ryc. 3d).

Zaobserwowane zmiany w aktywności enzymów GSHPx-zależnych wskazują, że kadm prowadzi do zużywania/osłabienia antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych w hepatocytach poddanych działaniu tego metalu.

Dwugodzinne narażenie izolowanych hepatocytów na kadm w stęż. 25 i 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ powoduje wyraźne obniżenie aktywności cał. GSHPx i GST odpowiedzialnych nie tylko za unieczynnianie nadtlenu wodoru, ale również nadtlenu organicznych, czy endo- i egzogennych związków elektrofilowych. O stresie oksydacyjnym w hepatocytach poddanych działaniu kadmu świadczy również spadek aktywności GSHR – enzymu odpowiedzialnego za odtwarzanie z GSSG zredukowanej formy GSH.

Niewydolność antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych upośledza w hepatocytach eliminację RFT, co zmniejsza ich zdolność do funkcjonowania w warunkach stresu oksydacyjnego. Powstające w wyniku działania RFT uszkodzenia struktur komórkowych prowadzą do utraty integralności hepatocytów (27, 30, 31).

Komórki wątroby są w stanie bronić się przed działaniem RFT i ich pochodnych. Zaobserwowane różnice w aktywności cał. GSHPx oraz stężeniu GSH w hepatocytach narażonych jedną godzinę na działanie kadmu w porównaniu z dłuższym czasem ekspozycji na ten metal wskazują na wyczerpywanie się w nich antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych. Natomiast wzrost aktywności GST i GSHR w hepatocytach poddanych działaniu kadmu przez dłuższy czas, w najwyższym zastosowanym stężeniu tego związku świadczy o adaptacji komórek do funkcjonowania w warunkach stresu oksydacyjnego.

W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że mechanizm toksycznego działania kadmu w hepatocytach poddanych działaniu kadmu jest wielokierunkowy. Związany jest nie tylko z indukcją peroksydacji lipidów, ale również ze zdolnością wiązania grup – SH obecnych w GSH i zmianami aktywności enzymów GSH-zależnych.

WNIOSKI

Ekspozycja izolowanych hepatocytów na działanie kadmu prowadzi do podwyższenia poziomu peroksydacji lipidów, zmian aktywności enzymów GSH-zależnych i spadku stężenia GSH, co wskazuje na osłabienie w nich antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych.

H. Czeczot, M. Skrzycki, M. Majewska, M. Podsiad, W. Karlik,
D. Grono, M. Wiechetek

CHANGES OF GSH-DEPENDENT ENZYMES ACTIVITIES IN ISOLATED RAT
HEPATOCYTES EXPOSED TO CADMIUM

Summary

Cadmium effect on activities of GSH-dependent enzymes in isolated rat hepatocytes was evaluated. Isolated rat hepatocytes incubated 1 and 2h with 25, 50, 200 μM cadmium chloride (CdCl_2) in modified Williams' medium E (WME) were used in the experiment. Hepatocytes incubated in MWE with tested concentration of cadmium chloride were used as the control. Total glutathione peroxidase (GSHPx), selenium-dependent glutathione peroxidase (SeGSHPx), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GSHR), concentration of reduced glutathione (GSH) and level of lipid peroxidation (TBARS) in isolated rat hepatocytes incubated with cadmium were determined. Increased level of lipid peroxidation, together with changes in activity of GSH-dependent enzymes and decreased concentration of GSH in isolated hepatocytes indicate that cadmium impairs the cellular antioxidative defense mechanisms.

PIŚMIENNICTWO

1. 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. – 2. Kolacz R., Dobrzański Z., Bodak E.: Biokumulacja Cd, Pb i Hg w tkankach zwierząt. *Medycyna Wet.* 1996; 52: 686-691. – 3. 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. – 4. Waalkes M.P.: Cadmium carcinogenesis. *Mut. Res.*, 2003; 533: 107-120. – 5. Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D.: Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 2003; 192: 95-117. – 6. 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. – 7. Mlynek V., Skoczyńska A.: Prozaplane działanie kadmu. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 1-8. – 8. Bonda E., Włostkowski T., Krasowska A.: Metabolizm i toksyczność kadmu u człowieka i zwierząt. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*. 2007; 1-2: 87-97. – 9. Pastore A., Fedrici E., Bertini F., Piemonte S.: Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.*, 2003; 33: 19-39. – 10. Pourahmad J., O'Brien P.J.: A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu^{+2} and Cd^{+2} . *Toxicology*. 2000; 143: 263-273.

11. 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. – 12. 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. – 13. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa, 2004. – 14. Hayes J.D., McLellan L.L.: Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1999; 31: 273-300. – 15. Łukaszewicz-Hussain A.: Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu. *Med. Pracy*. 2003; 54: 473-479. – 16. Sen C.K.: Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell Regul.*, 2000; 36, 1-30. – 17. Sies H.: Glutathione and its cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 27: 916-921. – 18. Tennant R.J.: Evaluation of trypan blue techniques for determination of cell viability. *Transplant.*, 1964; 2: 685-694. – 19. Wendel A.: Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981; 77: 325-333. – 20. Paglia D., Valentine W.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 1967; 70: 158-168.

21. Habig W.H., Pabst M., Jacoby W.: Glutathione S-transferase, the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974; 249: 7130-7139. – 22. Golberg D.M., Spooner R.J.: Glutathione reductase. W: Bregmayer H.V.: *Methods Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 1983; 3: 258-265. – 23. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 1979; 25: 192-205. – 24. Ellman G.L.: SH groups determination in biological fluids. *Anal. Biochem.*, 1970; 46: 237-243. – 25. 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. – 26. *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. – 27. *Pourahmad J., O'Brien P.J., Jokat F., Daraei B.*: Carcinogenic metal induces reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicol. Vitro.* 2003; 17: 803-810. – 28. *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. – 29. *Fariss M.W.*: Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes. *Toxicology.* 1991; 69: 63-77. – 30. *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.

31. *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.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.