

Artur Błoński¹⁾, Ewa Dąbrowska¹⁾, Małgorzata Czygier²⁾, Małgorzata Brzóska³⁾
Maciej Szmitkowski²⁾

OCENA AKTYWNOŚCI KATALAZY W ŚLINIANCE PRZYUSZNEJ SZCZURÓW EKSPONOWANYCH NA KADM I/LUB CYNK.

¹⁾ Zakład Stomatologii Społecznej i Profilaktyki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: dr hab. E. Dąbrowska

²⁾ Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: prof. M. Szmitkowski

³⁾ Zakład Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: dr hab. M. Brzóska

Celem pracy była ocena aktywności katalazy w tkance ślinianki przyusznej szczurów eksponowanych na kadm i/lub cynk. Materiał do badań stanowiły ślinianki przyuszne szczurów samców szczepu Wistar, którym podawano z wodą do picia chlorek kadmu i /lub chlorek cynku. Aktywność katalazy (CAT) po uprzedniej homogenizacji ślinianek określono przy użyciu zestawów firmy Cayman metodą ELISA. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono brak istotnego wpływu rozdzielnego lub łącznego podawania kadmu i cynku w badanej śliniance przyusznej szczurów. Może to sugerować, że badany gruczoł nie generuje ditlenku dwuwodoru (H_2O_2) w wyniku ekspozycji na badane jony metali.

Hasła kluczowe: katalaza, ślinianka przyuszna, szczur, kadm, cynk.
Key words: catalase, parotid salivary gland, rat, cadmium, zinc.

Stres oksydacyjny jest to stan zagrożenia organizmu, w którym procesy peroksydacyjne uzyskują przewagę nad procesami antyoksydacyjnymi prowadząc do zaburzeń metabolicznych, uszkodzeń a nawet śmierci komórek (1, 2). Organizmy wytworzyły szereg mechanizmów chroniących je przed działaniem reaktywnych form tlenu RFT (3). Związki, które reagują bezpośrednio z aktywnymi formami tlenu (powodując ich unieczynnienie) nazywa się antyoksydantami (przeciwutleniaczami) lub zmiataczami wolnych rodników. Najbardziej rozpowszechnionym podziałem jest wyróżnienie antyoksydantów enzymatycznych i nieenzymatycznych (1, 4). Katalaza (CAT) katalizuje reakcję dysmutacji nadtlenku wodoru. Obecna jest głównie w peroksysomach komórek ssaków. Katalaza wykazuje dwie aktywności: - katalazową – przy wysokim stężeniu H_2O_2 główną jej funkcją jest udział w rozkładaniu H_2O_2 do wody i tlenu i - peroksydazową – przy niskim stężeniu H_2O_2 katalizuje reakcję utleniania etanolu, metanolu, mrówczanu, azotynów, chinonów i innych. W reakcji tej H_2O_2

jest substratem, który jest redukowany do wody przez związki będące donorami wodoru (SH_2).

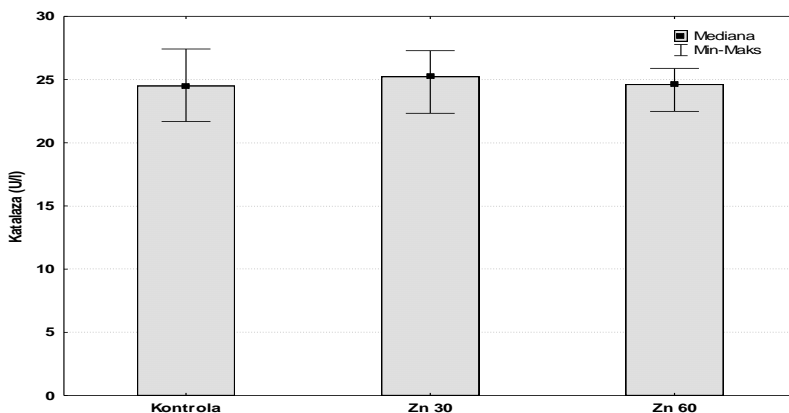
Celem pracy była ocena aktywności katalazy w tkance ślinianki przyusznej szczurów ekspozowanych na kadm i/lub cynk podawanych w postaci chlorku kadmu i chlorku cynku z wodą do picia.

MATERIAŁ I METODY

W realizacji celu badawczego zastosowano model doświadczalny na zwierzętach laboratoryjnych. Na przeprowadzone doświadczenie uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 3/2004. Materiał do badań stanowiły ślinianki przyusne 54 szczurów samców szczepu Wistar. Do badań użyto wodny roztwór chlorku kadmu- CdCl_2 o stężeniu 5 mg Cd/dm^3 odpowiadający narażeniu środowiskowemu populacji generalnej na kadm oraz wodny roztwór CdCl_2 o stężeniu 50 mg Cd/dm^3 odpowiadający zwiększonemu narażeniu zawodowemu na kadm. Cynk podawano w wodnych roztworach chlorku cynku - ZnCl_2 w stężeniu 30 mg Zn/dm^3 i w stężeniu 60 mg Zn/dm^3 . Szczury podzielono na dziewięć grup badawczych (po sześć osobników) w zależności od rodzaju i stężenia podawanych metali. Grupa kontrolna – zwierzęta otrzymywały do picia wodę nie zawierającą kadmu ani cynku, grupa Zn30, grupa Zn60, grupa Cd5, grupa Cd50, grupa Cd5 + Zn30, grupa Cd5 + Zn60, grupa Cd50 + Zn30, grupa Cd50 + Zn60. Po zakończeniu 6 miesięcznej ekspozycji na Cd i/lub Zn zwierzęta uśmiercono w stanie głębokiej narkozy wywołanej przez Vetbutal (Biovet, Polska) zgodnie z zaleceniami Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Wypreparowane ślinianki przyusne zamrożono w temperaturze -80°C . Po rozmrożeniu ślinianki były ważone i homogenizowane z $0,1 \text{ M}$ buforem fosforanowo-sodowym o pH 7,4 w stosunku 1:4. Następnie homogenizat został odwirowany w 4°C z prędkością $14000/\text{min}$ przez 10 minut. Uzyskany supernatant wykorzystano do oznaczenia katalazy (CAT, nr katalogowy enzymu EC 1.11.1.6.). Aktywność katalazy (CAT) określono przy użyciu zestawów firmy Cayman Chemicals Company, metodą ELISA, (podwójnego wiązania - „sandwicz”) (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) według instrukcji producenta. Aktywność CAT wyrażono w jednostkach na litr (U/l). Analizę statystyczną oraz ilustrację graficzną uzyskanych wyników wykonano za pomocą pakietu statystycznego Statistica 9 PL.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

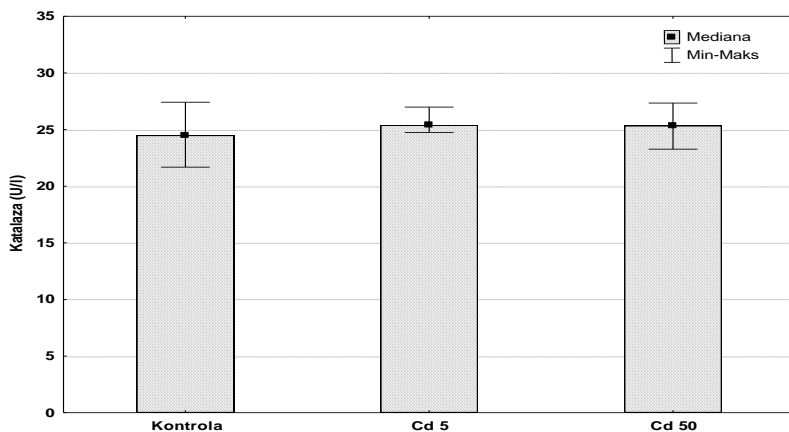
Aktywność katalazy w grupach zwierząt otrzymujących jedynie cynk zarówno w mniejszym i większym stężeniu nie wykazała istotnych zmian w stosunku do grupy kontrolnej i była bardzo do tej grupy zbliżona (ryc. 1).



Ryc. 1. Aktywność katalazy w grupach otrzymujących 30mg Zn/dm³ i 60 mg Zn /dm³.

Fig. 1. Catalase activity in groups receiving 30 mgZn/dm³ and 60 mgZn/dm³.

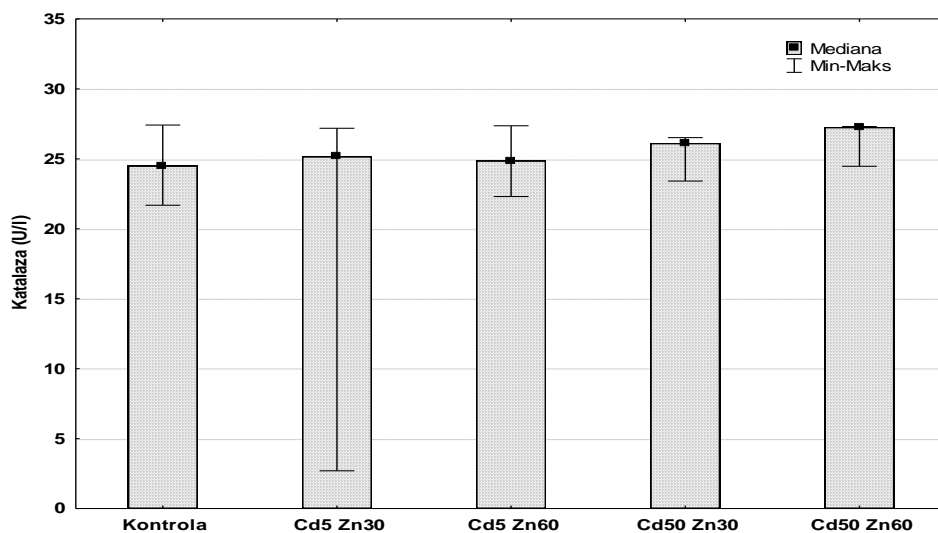
Podobnie podawanie zwierzętom kadmu w obu zastosowanych stężeniach nie wykazało istotnej zmiany aktywności badanego enzymu w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 2).



Ryc. 2. Aktywność katalazy w grupach otrzymujących 5 mgCd/dm³ i 50 mgCd/dm³.

Fig. 2. Catalase activity in groups receiving 5 mgCd/dm³ i 50 mgCd/dm³.

Łączne podawanie kadmu i cynku niezależnie od stężeń obu metali również jak w przypadku ich rozdzielnego podawania nie zmieniło istotnie aktywności badanego enzymu antyoksydacyjnego katalazy (ryc. 3).



Ryc. 3. Aktywność katalazy w grupach otrzymujących jednocześnie Zn i Cd.

Fig.3. Catalase activity in groups receiving Zn and Cd simultaneously.

Zaznaczała się jedynie niewielka tendencja jej wzrostu w grupie otrzymującej jednocześnie najwyższe stężenie kadmu i cynku w stosunku do grupy kontrolnej. W pierwszej fazie działania kadmu następuje wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, które wzmagają reakcje obronne ustroju. Jest to odpowiedź adaptacyjno-obronna. W drugiej fazie dochodzi do nasilonej peroksydacji lipidów błonowych. Docelowym miejscem dla toksycznego działania kadmu na poziomie komórki są mitochondria (5). Kadm hamuje aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej zaburzając jednocześnie procesy fosforylacji błon mitochondrialnych. Cynk może łagodzić toksyczne działanie kadmu. Ponieważ przedstawiona praca jest częścią pionierskich badań dotyczących udziału poszczególnych śluzianek w procesach oksydo-redukcyjnych przy ekspozycji na kadm i/lub cynk badania nasze możemy porównać z wcześniejszymi własnymi wynikami wpływu kadmu i cynku na śliniankę podżuchwową szczura.

Wynika z niego że ślinianki podżuchwowe kumulują kadm i zależy to od czasu i stężenia podanego z wodą do picia chlorku kadmu (6). Jednocześnie w śliniance podżuchwowej potwierdzono wzrost ilości metalotioneiny białka, które w odruchu obronnym przed toksycznym działaniem wiąże jony kadmu (7).

W tkance ślinianki przyusznej szczura nie zauważono wpływu ekspozycji na kadm i/lub cynk na aktywność katalazy. Natomiast badając aktywność CAT w największej śliniance podżuchwowej u szczura uzyskano obniżenie aktywności tego enzymu w zależności od dawki kadmu. Podawanie badanym grupom zwierząt chlorku cynku prowadziło również do statystycznie istotnego obniżenia aktywności badanego enzymu w tkance ślinianki podżuchwowej. Cynk w stężeniu 30 i 60 mg

Zn/dm³ podawany łącznie z kadmem w niższym lub wyższym stężeniu również prowadził do istotnego statystycznie spadku aktywności katalazy w stosunku do grup eksponowanych tylko na kadm. Podobne zależności dotyczyły również badanej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), której zmniejszenie aktywności obserwowano przy narażeniu na kadm i/lub cynk w tej samej śliniance podżuchwowej (8). Podobne obniżenie aktywności CAT otrzymał Jemai i wsp. badając u szczurów aktywność tego enzymu w erytrocytach (9). Jedynie w badaniach Nogueira i wsp. w śliniance przyusznej szczurów z cukrzycą również nie wykazano istotnych zmian w aktywności CAT (10). Rainer Fried wysunął hipotezę, w myśl której SOD i CAT są enzymami bardziej regulacyjnymi niż obronnymi: ich główną funkcją metaboliczną jest nie tyle obrona przed RFT, lecz utrzymywanie stacjonarnych stężeń RFT w różnych przedziałach komórek na właściwym poziomie RFT (11). Bardzo ważnym mechanizmem toksycznego działania kadmu jest uszkodzenie bariery antyoksydacyjnej organizmu, zaburzenie homeostazy i jego wpływ na powstanie stresu oksydacyjnego (12). Otrzymane wyniki dla ślinianki podżuchwowej wskazują na większą wrażliwość toksycznego działania kadmu w postaci nadmiernego wytwarzania H₂O₂ w porównaniu z ślinianką przyuszną. Być może każda ze ślinianek (podżuchwowa, przyuszną i podjęzykowa) w różny sposób reaguje na procesy oksydoredukcyjne przy ekspozycji na kadm i cynk. Jest to tematem dalszych rozważań zespołu badawczego stomatologów toksykologów i analityków medycznych.

WNIOSEK

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono brak istotnego wpływu rozdzielnego lub łącznego podawania kadmu i cynku w badanej śliniance przyusznej szczurów na aktywność CAT. Może to sugerować, że badany gruczoł nie generuje H₂O₂ w wyniku ekspozycji na badane jony metali.

A. Błoński, E. Dąbrowska, M. Czygier, M. Brzóska, M. Szmitkowski

ASSESSMENT OF CATALASE ACTIVITY IN THE PAROTID SALIVARY GLAND OF RATS EXPOSED TO CADMIUM AND/OR ZINC

Summary

Oxidative stress is a dangerous condition in which peroxidation processes prevail over antioxidant ones, leading to metabolic disorders, cell damage or even cell death. This condition may have physiological and pathological causes. Organisms have developed a number of mechanisms protecting them from the action of reactive oxygen species (ROS), e.g. detoxication, i.e. elimination of ROS via the enzymatic pathway. Catalase catalyses dismutation of hydrogen peroxide, whose level increases due to the toxic action of cadmium. Zinc can alleviate the effects of cadmium exposure.

The objective of the study was to assess the activity of catalase in the parotid salivary gland of rats exposed to cadmium and/or zinc.

Parotid salivary glands of male Wistar rats were used as material for analysis. The rats were given cadmium chloride and/or zinc chloride to drink. The activity of catalase (CAT) following homogenization of the parotid salivary glands was determined using kits from the Cayman Chemicals Company, using the ELISA sandwich according to the producer's instructions.

The findings revealed a lack of significant effects of separate or combined administration of cadmium and zinc in the rat parotid salivary gland for CAT activity. This may suggest that the gland does not generate H_2O_2 as a result of exposure to the metals studied.

PIŚMIENNICTWO

1. Ciężka E., Surdacka A.: Rola śliny w procesie stresu oksydacyjnego – przegląd piśmiennictwa. *Dental Forum*, 2007; 1:53-57. - 2. Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress – inducer cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 2006; 10, 160: 1-40. - 3. Sobaniec H.: Mechanizmy ochronne przed toksycznym działaniem tlenu a choroby przyzębia. *Mag. Stomat.*, 2000; 9: 29-32. - 4. Pużanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M.: Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu, *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010; 1:9-14. - 5. Pasternak K., Papierkowski A., Majdanik M.: Wpływ niektórych metali na stężenie magnezu i wapnia w mitochondriach wybranych tkanek szczura. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia*, 2001; 8: 55-60. - 6. Dąbrowska E., Szmitowski M., Kulikowska-Karpińska E., Łapińska J., Letko R.: Cadmium content in the rat submandibular salivary gland depending on Cd dose and exposure time. *Pol. J. Environm. Stud.*, 2009; 18, 6A: 169-172. - 7. Ewa Dąbrowska, R. Letko, M. Galażyn – Sidorczuk, E. Kulikowska-Karpińska, J. Łapińska: Effect of exposure to cadmium on the level of metallothionein in the rat submandibular gland. *Pol. J. Environm. Stud.*, 2009; 18, 6A:186-189. - 8. Kamecka-Białowarczuk E.: Wpływ kadmu i cynku na wybrane parametry układu oksydacyjno-redukcyjnego w śliniance podżuchwowej szczura. *Rozprawa doktorska, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku*, 2010, promotor: Dąbrowska Ewa. - 9. Jemai H., Messaoudi I., Chaouch A., Kerkeni A.: Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. *J. of Trace Elements in Med. And Biol.*, 2007; 21: 269-273. - 10. Nogueira F., Carvalho A., Yamaguti P., Nicolau J.: Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin. Chim. Acta*, 2005; 353: 133-139.
11. Fried R., Fried L.W., Babin D.R.: Biological role of xanthine oxidase and tetrazolium-reductase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 1973; 33: 439-445. - 12. Dąbrowska E., Kierklo A., Łapińska J., Letko R., Balunowska M.: Cadmium influence on masticatory organ. *Pol. J. Environm. Studies*, 2007; 5(C):126-129.

Adres: 15-267 Białystok, ul. Akademicka 3.