Veterinaria, Vol. 66, No. 2, 2017
Stručni članak (*non peer review*)

Uporedni pregled ćelijskih puteva i biohemijskih efekata jona hroma

Andi Alijagić, Erna Islamagić*, Damir Suljević

Sažetak

Efekti hroma kao suplementa ishrani, istraživani su dosada na brojnim životinjama. Većina studija je koristila hrom-pikolinat ili hrom hlorid kao izvor hroma, dok su hrom-nikotinat ili kvasac obogaćen hromom korišteni u samo nekoliko studija. Adekvatna preporuka u pogledu količine Cr(III) još uvijek ne postoji, jer su efekti djelovanja hroma koji je dodat kao suplement ishrani životinja vrlo kontradiktorni. Trovalentni hrom je na neke životinje imao pozitivne efekte, a na neke štetne. Za šestovalentni hrom se sa sigurnošću zna da predstavlja izuzetno toksičnu supstancu i nipošto ne bi trebao biti dio ishrane. Nakon primjene Cr(VI), vrijednosti alanin aminotransferaze i sukcinat dehidrogenaze rastu nekoliko puta u odnosu na referentne vrijednosti. Koncentracija kreatin kinaze se dvostruko povećava. U većini studija koncentracija žučnih kiselina i holesterola raste u odnosu na kontrolnu grupu, dok u drugim studijama dolazi do pada koncentracije holesterola i triglicerida. Hrom ima veliki uticaj na signalne puteve koji su povezani sa unosom i metabolizmom glukoze. Hrom povećava kinaznu aktivnost inzulinskog receptora β, prilikom čega se povećava aktivnost nizvodnih efektora inzulinskog signaliziranja, poput PI3 kinaze i Akt serin/treonin kinaze, što za posljedicu ima povećanu translokaciju Glut4 receptora na površinu ćelije. Povećana ekspresija transkripata gena za glutation sintazu, hem oksigenazu 2 i peroksiredoksin je utvrđena u ćelijama tretiranim hromom. Dodatno, hrom inhibira hidrogen-peroksidom posredovanu oksidaciju tiola i lipidnu peroksidaciju. Sumarno, oksidacija Cr(III) jedinjenja vodi nastanku Cr(V) i Cr(VI) vrsta koje mogu reagirati sa cisteinskim reziduama PTP-a, što vodi povećanju nivoa fosforilacije tirozina i alteracijama u ćelijskom signaliziranju, uključujući povećanje aktivnosti receptora za inzulin.

Ključne riječi

hrom, signalni putevi, biohemijski parametri

Odsjek za biologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Zmaja od Bosne 33-35, Bosna i Hercegovina
*Autor odgovoran za korespodenciju: erna.islamagic@hotmail.com

Uloge jona hroma u biološkim sistemima

Brojne primjene hroma u industriji su istakle hrom kao jedan veoma važan ekonomski element. Istovremeno, utvrđeni su negativni efekti hroma na ljudsko zdravlje. Hrom kao čist element nema nikakav negativan efekat (4). Jedino su trovalentni i šestovalentni hrom biološki bitni derivati hroma. Općenito dejstvo hroma na biološke sisteme nikad nije formulirano (7). Oksidacija trovalentog hroma se nikada ne dešava u biološkim sistemima, dok se redukcija šestovalentnog hroma spontano dešava u organizmu; iznimka je nerastvorljivi oblik šestovalentnog hroma. Šestovalentni hrom se u krvi brzo reducira do trovalentnog hroma, prolazi membranu eritrocita te se veže za ćelijske molekule i ne može napustiti eritrocite (7).

Ekstracelularni, hidrosolubilni, šestovalentni hrom postoji u formi hromatnog oksianjona. Tetraedarni raspored oksigeničnih grupa šestovalentnog hroma tvori strukturu sličnu strukturi fosfata i sulfata, što omogućava njegov jednostavan i nespecifičan transport pomoću sulfatnih ili fosfatnih anjonskih transportera u ćelijskoj membrani (17). Ovako jednostavan transportni mehanizam osigurava daleko veću koncentraciju šestovalentnog hroma u ćeliji u odnosu na vanćelijsko okruženje. Hrom je u šestovalentnom stanju termodinamički stabilan u vodi i ne reagira sa molekulom DNK. Ipak, šestovalentni hrom je izuzetno oksidirajuće sredstvo i kada jednom uđe u ćeliju, prolazi kroz proces ubrzane redukcije (Slika 1.).

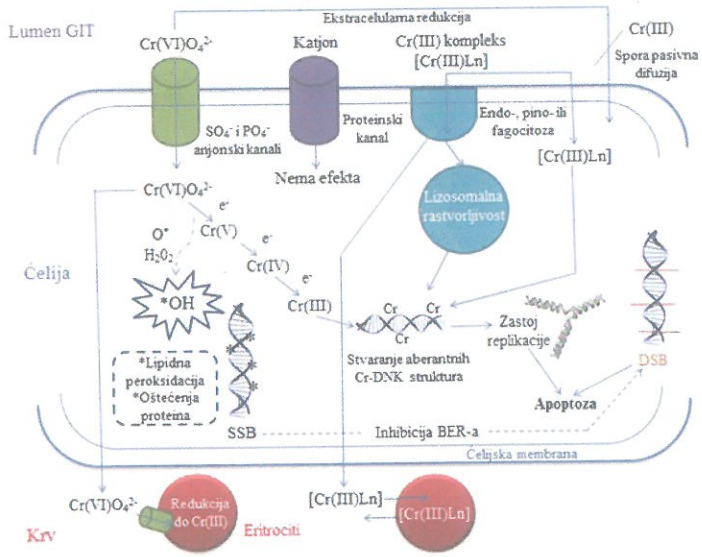
Redukcija šestovalentnog hroma je najčešće posredovana neenzimskim reduktantima, kao što su: askorbat (vitamin C), tioli male molekularne mase, GSH i cistein. Drugi potencijalni reduktanti su: citohrom P450 reduktaza, NAD(P)H-ovisni flavoenzimi i mitohondrijalni elektron transportni kompleksi (19).

Postoje dva teorijska puta intracelularne redukcije šestovalentnog hroma. Kada je prisutno mnogo reduktanata u ćeliji, proces se odvija kroz dvoelektronsku redukciju do četverovalentnog hroma, odmah nakon toga slijedi jednoelektronska redukcija do trovalentnog hroma. Ako je u ćeliji niska koncentracija reduktanata, prvi korak ovog procesa predstavljaju dva odvojena jednoelektronska procesa u toku kojih nastaju dva intermedijera, petovalentni i četverovalentni hrom te naposlijetku trovalentni hrom. Trovalentni hrom je konačni produkt redukcije šestovalentnog hroma u ćeliji; sadrži šest koordinacijskih mjesta koja omogućavaju stvaranje stabilnih kompleksa sa aminokiselinama, proteinima, RNK i DNK molekulama. *In vitro* studije su pokazale da se najveći dio hroma za DNK veže već u toku jednosatne inkubacije (5).

Djelovanje jona hroma na biohemijsko-fiziološke procese u ćeliji

Efekt hroma, kao dodatka ishrani, istraživan je dosad na brojnim životinjama uključujući: krave, svinje, ovce, ptice, konje, zečeve i ribe. Većina studija je koristila $Cr(pic)_3$ (hrom-pikolinat) ili $CrCl_3$ (hrom hlorid) kao izvor hroma, u nekoliko studija je korišten hrom-nikotinat ili kvasac obogaćen hromom (uzgajan na podlozi bogatoj hromom). Ipak, pravilna preporuka još uvijek ne postoji, jer su vrlo kontradiktorne posljedice dodavanja hroma u ishranu pobrojanih životinja. Sigurno je da hrom (trovalentni) na neke životinje djeluje povoljno, a na neke štetno, dok se za šestovalentni hrom sa sigurnošću zna da predstavlja izuzetno toksičnu supstancu i nipošto ne bi trebao biti dijelom ishrane.

Hrom (trovalentni) je esencijalan mikroelement i za ljude i za životinje (16). Zadnjih godina izražen je interes za praćenje utilizacije unesenog hroma kroz ishranu životinja. Nekoliko studija je istraživalo povezanost između valencije hroma i njegove kancerogenosti (14). Povoljan efekat hroma na ljudsko zdravlje je opisan kroz činjenicu da je hrom integralni dio glukoza tolerantnog faktora (GTF), koji promovira dejstvo inzulina, jednog od najznačajnih anaboličkih hormona (3). GTF se sastoji od jednog atoma trovalentnog hroma koji je povezan za nekoliko molekula niacina (vitamina B3) i aminokiselina pronađenih u glutationu (glutaminska kiselina, glicin i cistein). Bez hromne jezgre, GTF je inaktivan (9). Inzulin regulira produkciju energije, mišićnu depoziciju, metabolizam masti i utilizaciju holesterola. Ukoliko je nivo inzulina nizak, glukoza ne može biti utilizirana te se konvertira u masti i skladišti u adipocitima. Nadalje, ako odgovarajuća aminokiselina ne može ući u ćeliju, mišići se ne mogu „oporavljati" (9). Zabilježeno je da dodatak hroma kao suplementa ishrani zdravih pacova i ljudi poboljšava toleranciju spram glukoze i vezivanje inzulina, stoga se može reći da utiče na normalizaciju nivoa glukoze u krvi. Dodatak trovalentnog hroma ishrani ima pozitivno dejstvo i na rast peradi (6). Osim toga, hrom ima ključnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata, lipida i proteina kod ljudi, ali i stoke. Organska forma hroma se apsorbira 20-30 puta brže nego anorganska. Povećanje koncentracije hroma u ishrani dokazano povećava jetru životinje koja je konzumira i do 50%. Pokazano je da tretman trovalentnim hromom dovodi do minimalnih fluktuacija u koncentraciji



Slika 1. Sudbina šestovalentnog i trovalentnog hroma u enterocitima: putevi redukcije šestovalentnog hroma, posljedice dejstva trovalentnih i šestovalentnih hromnih jona na ćelijske molekularne sisteme; SSB – Single Stranded Breaks ili jednolančani lomovi DNK, DSB – Double Stranded Breaks ili dvolančani lomovi DNK, BER – Base Excision Repair enzimi ili enzimi uključeni u ekscizijski popravak DNK, [Cr(III)Ln] – različiti ligandi vezani za trovalentni hrom; ligandi mogu biti različite aminokiseline te proteini poput albumina, transferina i imunoglobulina.

biohemijskih parametara i aktivnosti enzima u serumu (2). U zadnje vrijeme brojni preparati koji sadrže hrom vezan u organske spojeve se prodaju kao zaštita životinja od stresa tokom uzgoja na farmama. Međutim, organski spojevi hroma koji se daju tovnim životinjama su jako koncentrirani, stoga je minimalno doziranje nužno, jer se često u životinjskom mesu koje se koristi u ljudskoj ishrani mogu naći velike doze akumuliranog hroma uslijed nestručnog rukovanja sa preparatima koji sadrže organski hrom. Trovalentni hrom unapređuje imunitet i rast. Hrom u nekim slučajevima povećava, a u nekim smanjuje vrijednosti serumskog holesterola, dok u nekim studijama nema nikakvog uticaja na koncentraciju serumskog holesterola (6). Kod tovnih svinja zabilježeno je povećanje slabinskih mišića i smanjenja količine leđnog masnog tkiva ukoliko se životinje hrane uz dodatak organskog hroma. Takvi rezultati nisu zabilježeni ako je izvor hroma neki anorganski spoj, poput hrom-hlorida u koncentraciji od 30 ili 60 ppb. Ukoliko se ishrani dodaje hrom u anorganskom obliku (20 ppb – Part Per Billion), tada dolazi do poboljšanja procesa rasta i hranidbene efikasnosti kod tovnih pilića (18). Dodatak organskog hroma u koncentraciji od 200 ili 400 ppb u hranu ne utiče na masu, ali utiče na unos hrane, azotnu retenciju i količinu mišićnog tkiva u pilićima. Dodatak organskog hroma u koncentraciji od 1200 ppb rezultira povećanjem kvaliteta jaja i koncentracije inzulina u serumu japanskih prepelica. Hrom-pikolinat ne utiče na tjelesnu masu ili na unos hrane kod pilića tokom 21 dana praćenja, ali je mortalitet pilića smanjen i kvalitet mesa je poboljšan unošenjem organskog hroma u vrijednosti od 300-400 ppb. Organski hrom povećava i prinos koka nosilja ukoliko su niske temperature. Većina pilića se hrani hranom biljnog porijekla, koja je siromašna hromnim jedinjenjima (8). Nedvojbeno je utvrđeno da kod oba spola pacova primjena šestovalentnog hroma uzrokuje promjene u koncentraciji brojnih biohemijskih parametara. Vrijednosti alanin aminotransferaze (ALT) i sukcinat dehidrogenaze (SDH) rastu nekoliko puta, pogotovo vrijednosti alanin transferaze, čija koncentracija u serumu raste i do četiri puta više u odnosu na referentne vrijednosti za tu vrstu. Koncentracija žučnih kiselina se također dvostruko povećava bez obzira na spol pacova. Kada je u pitanju koncentracija holesterola, dostupne informacije nisu ujednačene, ali ipak u većini studija koncentracija holesterola raste barem za 30% u odnosu na kontrolnu grupu, dok u drugim studijama dolazi do pada koncentracije holesterola. Koncentracija triglicerida skoro svaki put opada, a sve manje koncentracije triglicerida prati povećanje unosa šestovalentnog hroma. Koncentracija kreatin kinaze (CK) se dvostruko povećava (6, 1).

Molekularni mehanizmi djelovanja hroma u ćeliji

Hrom ima veliki uticaj na signalne puteve koji su povezani sa unosom i metabolizmom glukoze. Novija istraživanja su pokazala da hrom povećava kinaznu aktivnost inzulinskog receptora β, prilikom čega se povećava aktivnost nizvodnih efektora inzulinskog signaliziranja, poput PI3 kinaze i Akt serin/treonin kinaze, što za posljedicu ima povećanu translokaciju Glut4 receptora na površinu ćelije (15, 21). Hrom također utiče na aktivnost PTP-1B (protein tirozin fosfataza-1B), koja je negativni regulator inzulinskog signaliziranja i povećava ER-stres unutar ćelije, odvajanjem IRS (inzulin receptorski supstrat) od JNK (Jun NH(2)-terminalna kinaza) - posredovane fosforilacije serina i sprečavanjem naknadne ubikvitinizacije. Povećano eksprimiranje AMPK (AMP-aktivirana protein kinaza) od strane hroma vodi povećanom unosu glukoze. Hrom posreduje efluksu holesterola iz ćelijske membrane na način da potiče translokaciju Glut4 u ćelijsku membranu i unos glukoze (21).

Uloga hroma u nastanku oksidativnog stresa i razvoju dijabetesa je potvrđena u mnogim istraživanjima kao i potencijalni efekat hroma u regulaciji oksidativnog stresa i inflamaciji. Pokazano je da hrom umanjuje oksidativni stres u kulturi monocita i izolovanih mononuklearnih ćelija koje su izložene hiperglikemijskim uslovima. Pored smanjenja oksidativnog stresa, tretman hromom inhibira oslobađanje pro-inflamatornih citokina iz monocita koji su izloženi hiperglikemijskim uslovima (10). Također, utvrđeno je da hrom inhibira proteinsku glikozilaciju i lipidnu peroksidaciju eritrocita koji su izloženi visokoj koncentraciji glukoze. Dodatno, *in vitro* studije su pokazale da suplementi hroma uzrokuju smanjenje proinflamatornih citokina (TNF-alfa, IL-6, CRP), oksidativni stres i nivo lipida kod pacova kod kojih je dijabetes uzrokovan streptozotocinom (11).

Povećana ekspresija transkripata gena za glutation sintazu, hem oksigenazu 2 i peroksiredoksina je utvrđena u ćelijama tretiranim hromom. Dodatno, hrom inhibira hidrogen-peroksidom posredovanu oksidaciju tiola i lipidnu peroksidaciju (12). Suplementi hroma kod pretilih miševa vode smanjenju povećanog odnosa između oksidovane i redukovane forme glutationa i obrazovanje proteinskih karbonila (13).

Kod trudnih ženki pacova se pokazalo da smanjenje unosa hroma u periodu trudnoće vodi netoleranciji na glukozu u muškom potomstvu zbog promjena u DNK metilaciji koja je povezana sa inzulinskim signalnim putevima u jetri kod miševa. Ekspresija gena uključenih u inzulinski signalni put je bila smanjena u ovom istraživanju (22).

Sumarno, oksidacija Cr(III) jedinjenja vodi nastanku Cr(V) i Cr(VI) vrsta koje mogu reagirati sa cisteinskim reziduama PTP-a, što vodi povećanju nivoa fosforilacije tirozina i alteracijama u ćelijskom signaliziranju, uključujući povećanje aktivnosti receptora za inzulin (20). Ova hipoteza je potvrđena nakon analize povećanog stepena fosforilacije tirozina na sisarskim ćelijama tretiranim sa Cr(VI) kao i inzulin-mimetičkim efektom Cr(VI) kod životinja. S druge strane, prekid ćelijskog signaliziranja uzrokovan blokiranjem cisteinskih rezidua regulatornog enzima su glavni razlozi toksičnog djelovanja jedinjenja sa teškim metalima, uključujući i Cr(VI).

Literatura

1. Aitio A., Jarvisalo J., Kiilunen M., Kalliomaki P. (1988): Chromium. In: Clarkson L.F., Nordberg G., Sager P. Biological Monitoring of Toxic Metals. New York: Plenum, 369-82.
2. Alijagić A., Islamagić E., Fočak M., Suljević D. (2017): Effects of trivalent and hexavalent dietary chromium on blood biochemical profile in Japanese quails. BJVM, 1-8. Doi: 10.15547/bjvm.1095.
3. Anderson R., Polansky M. (1995): Dietary and metabolite effects on trivalent chromium retention and distribution in rats. Biol Trace Elem Res, 50:97-108.
4. Baruthio F. (1992): Toxic effects of chromium and its compounds. Biological Trace Element Research, 32(1):145–53.
5. Codd R., Dillon C., Levina A., Lay P. (2001): Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell. Coordin Chem Rev, 216:537-82.
6. Cupo M., Donaldson W. (1987): Chromium and vanadium effects on glucose metabolism and lipid synthesis in the chick. Poultry Sci, 66:120-26.
7. Dayan A., Paine A. (2001): Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allerginicity: Review of the literature from 1985 to 2000. Hum Exp Toxicol, 20:439-51.
8. Giri J., Usha K., Sunita T. (1990): Evaluation of the selenium and chromium content of plants foods. Plant Foods Hum Nutr, 40: 49p.
9. Hossain M., Barreto S., Silva C. (1998): Growth preformance and caracass composition of broilers fed supplemental chromium from chromium yeast. Anim Feed Sci Technol, 71:217-28.
10. Jain S.K., Kannan K. (2001): Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF-alpha secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. Biochem Biophys Res Commun, 289:687–91.
11. Jain S.K., Lim G. (2006): Chromium chloride inhibits TNFalpha and IL-6 secretion in isolated human blood mononuclear cells exposed to high glucose. Horm Metab Res, 38:60–2.
12. Jain S.K., Patel P., Rogier K. (2006): Trivalent chromium inhibits protein glycosylation and lipid peroxidation in high glucose-treated erythrocytes. Antioxid Redox Signal, 8:238–41.
13. Jain S.K., Rains J.L., Croad J.L. (2007): Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF-alpha, IL-6,. CRP, glycated hemoglobin, triglycerides, and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. Free Radic Biol Med, 43:1124–31.
14. Langard S. (1990): One hundred years of chromium and cancer: a review of epidemiological evidence and selected case reports. Amer J Intern Med, 17:189-215.
15. Mackowiak P., Krejpcio Z., Sassek M., Kaczmarek P., Hertig I., Chmielewska J., Wojciechowicz T., Szczepankiewicz D., Wieczorek D., Szymusiak H., Nowak K.W. (2010): Evaluation of insulin binding and signaling activity of newly synthesized chromium(III) complexes in vitro. Mol Med Report, 3:347–53.
16. McDonald P., Edwards R., Greenhalgh J. (1992): Minerali. U T. Nuove, Nutrizione Animale, fourth ed. (pp 88-113). Milano.
17. Salnikov K., Zhitkovich A. (2007): Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. Chem Res Ttoxicol, 21:28-44.
18. Steele N., Rosebrough R. (1981): Effect of trivalent chromium on hepatic lipogenesis by the Turkey Polut. Poultry Sci, 60:617-22.
19. Sugden K., Stearns D. (1999): The role of chromium (V) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. J Environ Pathol Toxicol Oncolo: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer, 19: 215-30.
20. van Montfort R.L., Congreve M., Tisi D., Carr R., Jhoti H. (2003): Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. Nature, 423:773–7.
21. Yang X., Li S.Y., Dong F., Ren J., Sreejayan N. (2006): Insulin-sensitizing and cholesterol-lowering effects of chromium (D-Phenylalanine)3. J Inorg Biochem, 100:1187–93.
22. Zhang Q., Sun X., Xiao X., Zheng J., Li M., Yu M., Ping F., Wang Z., Qi C., Wang T., Wang Z. (2017): Dietary Chromium Restriction of Pregnant Mice Changes the Methylation Status of Hepatic Genes Involved with Insulin Signaling in Adult Male Offspring. PLoS One, 12(1): e0169889.