

JAROSŁAW DUDKA, STANISŁAW SZCZEPANIAK

OCENA ŁĄCZNEGO WPŁYWU CHLORKU MIEDZIOWEGO
I AZOTYNU SODU NA POZIOM METHEMOGLOBINY I TRYPTOFANU
WE KRWI SZCZURA (NARAŻENIE SUBCHRONICZNE)

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF COPPER CHLORIDE
AND SODIUM NITRITE ON BLOOD METHEMOGLOBIN
AND TRYPTOPHAN LEVEL IN RATS (SUBCHRONIC EXPOSURE)

Katedra i Zakład Chemii Toksykologicznej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. St. Szczepaniak

Zbadano poziom methemoglobiny, hemoglobiny i tryptofanu we krwi szczurów otrzymujących chlorek miedziowy (ok. 0,03LD₅₀) i azotyn sodu (0,2 LD₅₀) przez 90 dni. Największe zmiany badanych parametrów zaobserwowano w grupie zwierząt narażonych na azotyn sodu.

Metale ciężkie oraz azotyny, obecne w środowisku, stanowią poważne źródło szkodliwego oddziaływania na szeroką populację ludzi. Głównym kierunkiem toksycznego wpływu azotynu na organizm zwierzęcy jest utlenianie hemoglobiny do methemoglobiny.

Methemoglobina nie posiada zdolności przenoszenia tlenu i wywołuje w ustroju hipoksję [13]. Można przewidywać, że organizm poddany równoczesnej ekspozycji na azotyny i metale ciężkie będzie reagował inaczej niż w sytuacji narażenia na sam azotyn. Przypuszczenie to znajduje uzasadnienie w tym, że mechanizmy obronne ustroju odpowiedzialne za rewersję methemoglobiny do hemoglobiny są zależne od szeregu enzymów, które mogą być aktywowane lub inaktywowane (w zależności od dawki) przez jony metali ciężkich [15].

Niniejsza praca dotyczy równoczesnego oddziaływania chlorku miedziowego i azotynu sodu na powstawanie methemoglobinemii u szczurów.

Dodatkowym aspektem tej pracy było określenie wpływu tych związków na poziom wolnego tryptofanu w osoczu. Zainteresowanie tym aminokwasem wynika z faktu, że główną drogą jego przemiany jest biotransformacja do kwasu nikotynowego (do syntezy serotoniny wykorzystywane jest jedynie około 1% tryptofanu) [7]. Kwas nikotynowy jest z kolei przekształcany w nukleotydy NAD i NADP, niezbędne w reakcjach enzymatycznych, redukcji methemoglobiny do hemoglobiny [6].

MATERIAŁ I METODYKA

Badania wykonano na 48 białych szczurach – samcach rasy *Wistar*, pochodzących z hodowli zwierząt laboratoryjnych w Brwinowie k. Warszawy. Zwierzęta o początkowej masie 220–270 g otrzymywały paszę standardową LSM i wodę *ad libitum*. Szczury podzielono na cztery grupy po 12 sztuk.

Każda grupa otrzymywała w odstępach dobowych przez 90 dni, sondą do żołądka badane związki w postaci wodnych roztworów.

Pierwsza grupa (I) otrzymywała azotyn sodu w dawce 30 mg/kg m.c. × dzień ($0,2 LD_{50}$); II grupa – chlorek miedziowy w dawce 4,67 mg/kg m.c. × dzień (ok. $0,03 LD_{50}$); III grupa – chlorek miedziowy i azotyn sodu w dawkach jak wyżej; IV grupa (kontrolna) otrzymywała wodę destylowaną.

Roztwory chlorku miedziowego, azotynu sodowego i wodę destylowaną podawano szczurom w objętości $0,5 \text{ cm}^3/200 \text{ g m.c.}$ Jedynie w grupie trzeciej, aby nie przekroczyć dziennej objętości podawanych roztworów w stosunku do pozostałych grup, zwierzętom podawano CuCl_2 i NaNO_2 (o dwukrotnie wyższych stężeniach) w obj. $0,25 \text{ cm}^3/200 \text{ g m.c.}$

W celu uniknięcia ewentualnej interakcji chemicznej w przewodzie pokarmowym szczurów grupy III CuCl_2 i NaNO_2 podawano w odstępach czterech godzin.

Do oznaczania methemoglobiny i hemoglobiny krew pobierano z ogona w 24 godziny po podaniu ostatniej dawki azotynu sodowego i/lub chlorku miedziowego; tryptofan oznaczano w krwi pobranej z tętnicy szyjnej w słabej narkozie eterowej.

W pełnej krwi określano poziom methemoglobiny metodą *Evelyna i Malloy'a* [5] oraz hemoglobiny wg *Drabkina* [1].

W osoczu oznaczono poziom wolnego tryptofanu wg *Meddineo i Musarry* [12]. We wszystkich przypadkach jako środka przeciwzakrzepowego używano heparyny.

Testem *t-Studenta* sprawdzono istotność różnic w średnich stężeniach oznaczanych parametrów w poszczególnych grupach badanych względem kontrolnej.

WYNIKI

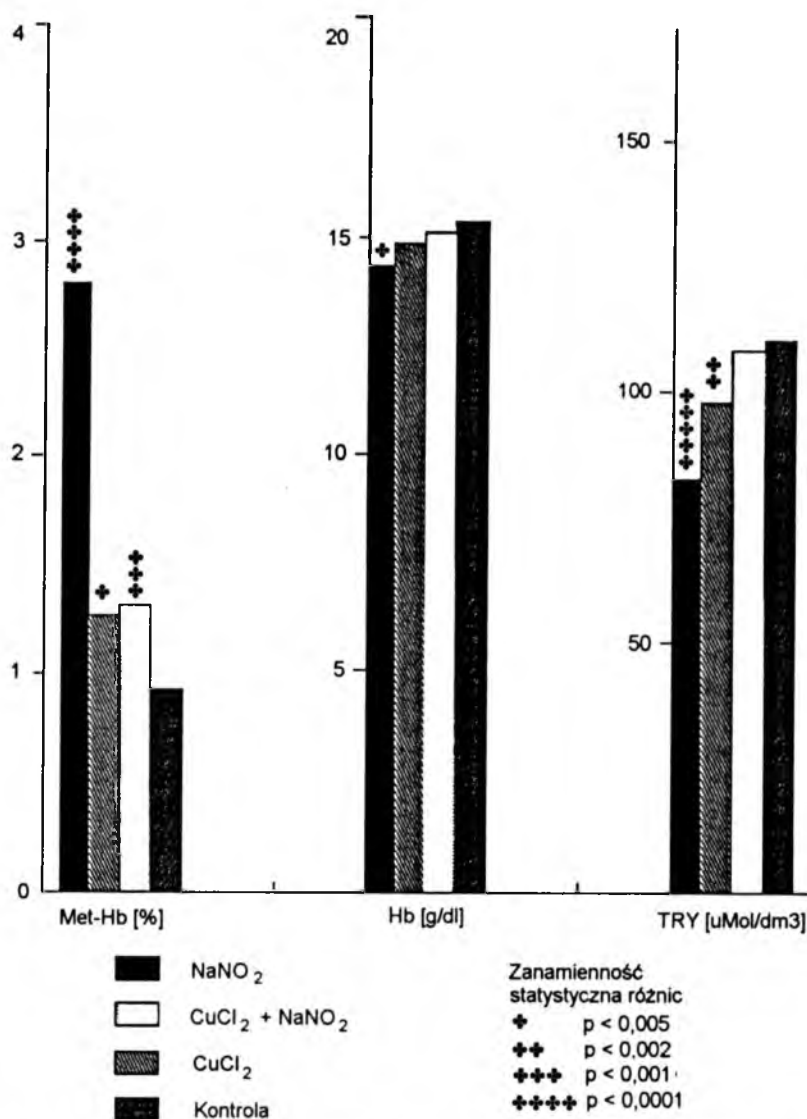
Wyniki oznaczeń methemoglobiny (Met-Hb) i hemoglobiny (Hb) we krwi oraz wolnego tryptofanu w osoczu (TRP) przedstawiono na rycinie 1 i w tabeli I, podając przedziały ufności ($\bar{x} \pm t_0 \bar{s}$) oraz istotności różnic między średnim poziomem w grupach badanych i grupie kontrolnej.

Tabela I. Poziom methemoglobiny (w % całkowitej hemoglobiny) i hemoglobiny ($\text{g}/100 \text{ cm}^3$ krwi) w pełnej krwi oraz wolnego tryptofanu w osoczu ($\mu\text{Mol}/\text{dm}^3$) u szczurów po 90 dniach intoksykacji.

The level of methemoglobin (in total hemoglobin %) and hemoglobin ($\text{g}/100 \text{ cm}^3$ of the blood) in whole blood and of free tryptophan in plasma ($\mu\text{Mol}/\text{dm}^3$) in rats intoxicated during 90 days.

Grupa szczurów	Parametr biochemiczny		
	Met-Hb	Hb	TRP
I (NaNO_2)	$2,83 \pm 0,74^{****}$ n = 9	$14,86 \pm 0,66^*$ n = 10	$77,13 \pm 5,73^{****}$ n = 11
II (CuCl_2)	$1,24 \pm 0,26^*$ n = 9	$15,28 \pm 0,85$ n = 9	$93,23 \pm 6,44^{**}$ n = 10
III ($\text{CuCl}_2 + \text{NaNO}_2$)	$1,33 \pm 0,24^{***}$ n = 11	$15,34 \pm 1,00$ n = 10	$102,06 \pm 6,63$ n = 10
IV (kontrola)	$0,94 \pm 0,15$ n = 11	$15,76 \pm 0,53$ n = 10	$104,53 \pm 7,31$ n = 10

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,02$; *** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,001$



Ryc. 1. Poziom methemoglobiny i hemoglobiny w pełnej krwi oraz wolnego tryptofanu w osoczu szczurów w poszczególnych grupach badanych
 The methemoglobin and hemoglobin level in whole blood and tryptophan level in plasma of rats in several groups

Stwierdzono podwyższenie poziomu methemoglobiny, w różnym stopniu, we wszystkich grupach zwierząt otrzymujących badane związki – najwyższy w grupie otrzymującej azotyn sodu.

Poziom hemoglobiny obniżył się jedynie po podaniu azotynu sodu stwierdzono również obniżenie stężenia wolnego tryptofanu w osoczu u szczurów otrzymujących

chlerek miedziowy ale spadek poziomu tego aminokwasu był bardziej istotny w grupie zwierząt otrzymujących azotyn sodu.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wpływ jonów metali ciężkich na procesy biochemiczne jest uwarunkowany między innymi zdolnością tworzenia wiązań z grupami sulfhydrylowymi enzymów. Ugrupowanie takie posiada również glutation. Odgrywa on kluczową rolę w utrzymaniu równowagi oksydo-redukcyjnej w ustroju i może tworzyć trwale kompleksy z miedzią [2]. Unieczynnienie glutationu powinno prowadzić do spadku zdolności redukcyjnej; a w erytrocycie przejawiałoby się to podwyższeniem poziomu hemoglobiny utlenionej (methemoglobiny). Z pewnością nie jest to jedyna przyczyna ewentualnego efektu methemoglobinotwórczego jonów miedzi. W badaniach *Ribarova* i *Benova* [9] w warunkach *in vitro* obok miedzi przebadano między innymi Hg^{2+} i Ag^+ , które znacznie łatwiej łączą się z grupami $-SH$, a mimo to największy efekt methemoglobinotwórczy autorzy uzyskali dla jonów Cu^{2+} .

Ponadto w doświadczeniach *in vitro* stwierdzono, że jony Cu^{2+} hamują znacząco aktywność nerkowej dehydrogenazy mleczanowej [4]. Można przewidywać, że analogiczna reakcja zachodzi prawdopodobnie również w erytrocytach. Założenie, że dehydrogenaza mleczanowa erytrocytu jest kluczowym enzymem biorącym pośredni udział w mechanizmie rewersji methemoglobiny do hemoglobiny, stanowi podstawę do przypuszczeń, że Cu^{2+} może mieć znaczny wpływ na ograniczenie redukcji methemoglobiny. Ci sami autorzy [4] sugerują możliwość utleniania NADH przez jon Cu^{2+} .

Inni autorzy donoszą, że podczas chronicznego narażenia owiec na miedź, poziom methemoglobiny osiągnął wartość 25–35% całkowitej ilości hemoglobiny we krwi [11].

Z przedstawionych faktów wynika, że po wprowadzeniu do organizmu jonów Cu^{2+} należy się spodziewać wzrostu methemoglobiny we krwi, zwłaszcza w przypadku, gdy mechanizmy przeciwutleniające erytrocytu są obciążone dodatkowo drugim ksenobiotykiem – azotynem sodu. Zarówno miedź jak i azotyn powinny uruchamiać ustrojowe mechanizmy (enzymy) antyoksydacyjne między innymi dlatego, że związki te mają zdolność tworzenia w ustroju wolnych rodników ponadtlennokowych [3, 10].

W przedstawionych badaniach najwyższy poziom methemoglobiny stwierdzono u szczurów otrzymujących azotyn sodu. Poziom methemoglobiny w tej grupie szczurów w 24 godziny po ostatnim (90-cio dniowym) podaniu wynosił średnio 2,83% i był znamienne wyższy ($p < 0,01$) w porównaniu z grupą kontrolną, w której wartość tego parametru utrzymywała się na poziomie 0,94%. Wzrost methemoglobiny u tych szczurów jest spowodowany przez azotyn, ale na ten efekt może nakładać się również oddziaływanie azotynu na enzymy, które odgrywają istotną rolę w omawianym procesie. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa i reduktaza methemoglobiny są hamowane przez wyższe stężenia azotynu sodu [8].

Istotne różnice w poziomie methemoglobiny stwierdzono również u szczurów otrzymujących sam chlorek miedziowy oraz w grupie szczurów narażonych łącznie na chlorek miedziowy i azotyn sodowy; obserwowane poziomy methemoglobiny wynosiły odpowiednio 1,24% i 1,33%.

Porównanie poziomów methemoglobiny u szczurów otrzymujących sam azotyn – 2,83% z grupą narażoną równocześnie na chlorek miedziowy i azotyn sodu (MetHb = 1,33%), wskazuje, że Cu^{2+} w podanych ilościach przesuwają równowagę układu redox w organizmie szczura na korzyść procesów redukcyjnych.

Narażenie zwierząt na badane związki przez 90 dni spowodowało obniżenie poziomu hemoglobiny we krwi, jedynie w grupie otrzymującej azotyn sodu. Prawdopodobnie jest to spowodowane ubytkiem hemoglobiny na rzecz methemoglobiny. W pozostałych przypadkach nie zauważono istotnych zmian zawartości hemoglobiny w porównaniu z grupą kontrolną.

Uzyskane wyniki wykazały również spadek poziomu wolnego tryptofanu w osoczu zarówno u szczurów otrzymujących CuCl_2 ($p < 0,02$) jak i bardziej istotny w grupie szczurów otrzymujących azotyn sodu ($p < 0,001$). Jedną z bardziej prawdopodobnych przyczyn takiej reakcji organizmu może być uaktywnienie szlaku przemiany tryptofanu przez kinureninę do kwasu nikotynowego [7], ponieważ w obecności związków methemoglobinoformujących wzrasta zapotrzebowanie na zredukowane nukleotydy NAD i NADP, a przez to i na kwas nikotynowy, będący jednym z substratów do ich syntezy [14].

WNIOSKI

1. Niewielki wzrost poziomu methemoglobiny (2,8%) stwierdzony u szczurów otrzymujących przez 90 dni azotyn sodu może świadczyć o dużej wydajności mechanizmów chroniących hemoglobinę przed utlenieniem.

2. Łączne 90-dniowe narażenie szczurów na azotyny i miedź osłabia efekt methemoglobinoformujący azotynów, co może świadczyć o antagonistycznym działaniu jonu Cu^{2+} w stosunku do azotynu sodu.

3. Stwierdzono w niniejszej pracy znaczny spadek poziomu tryptofanu w osoczu krwi szczurów narażonych na azotyn sodu może wiązać się ze zwiększoną przemianą tego aminokwasu do kwasu nikotynowego w warunkach wzrostu zapotrzebowania organizmu na zredukowane nukleotydy nikotynowe (NADH i NADPH).

J. Dudka, S. Szczepaniak

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF COPPER CHLORIDE AND SODIUM NITRITE ON BLOOD METHEMOGLOBIN AND TRYPTOPHAN LEVEL IN RATS (SUBCHRONIC EXPOSURE)

Summary

The study was performed on 4 groups of male Wistar rats, receiving p.o. through 3 months every day: 1) sodium nitrite in dose 30 mg/kg b.w. \times day ($0,2 \text{ LD}_{50}$); 2) copper chloride in dose 4.67 mg/kg b.w. \times day (0.03 LD_{50}); 3) copper chloride and sodium nitrite in amounts as above, and 4 – control group – received dest. water.

The methemoglobin and hemoglobin were determined in whole blood and tryptophan in plasma 24 hours after the last intoxication.

There was showed, that every day intoxication of rats with sodium nitrite cause the increase of methemoglobin concentration and decrease the free tryptophan level in the blood.

There was also observed, that copper chloride, administrated together with sodium nitrite, decreases significantly his methemoglobin-forming action.

PIŚMIENNICTWO

1. *Angielski S.*: Biochemia kliniczna i analityka. PZWL Warszawa 1985, 672. – 2. *Bartosz G.*: Metabolizm glutationu. Post. Biochem. 1993, 39, 32. – 3. *Calabrese E.J.*: Age and susceptibility to toxic substances. A Wiley – Interscience Publication, New York, 1986, 81. – 4. *Dobryszycka W., Owczarek N.*: Effects of lead, copper and zinc on the rat's lactate dehydrogenase *in vivo* and *in vitro*. Arch. Toxicol. 1981, 48, 21. – 5. *Evelyn K.A., Malloy H.T.*: J. Biol. Chem. 1938, 126, 655. – 6. *Harper H.A., Rodwell V.W., Mayes P.A.*: Zarys chemii fizjologicznej. PZWL Warszawa 1983, 117, 229. – 7. *Koron M., Korzon T.*: Kliniczne znaczenie zaburzeń metabolizmu tryptofanu. Pol. Tyg. Lek. 1978, 33, 783. – 8. *Lesiecki W., Jacyszyn K.*: Działanie methemoglobinoformujące *in vitro* związków nitrynowych oraz ich równoczesny wpływ na aktywność dehydrogenazy glukozoo-6-fosforanowej i reduktazy methemoglobiny. Bromat. Chem. Toksykol. 1982, 15, 185. – 9. *Ribarov S., Benov L.*: Effect of the ions of some heavy metals on the activity of the methemoglobin reductase. Sci. Works Higher Med. Inst. – Pleven 1982, 4, 56. – 10. *Sedlak J., Lindsay R.H.*: Estimation of total, proteinbound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with *Ellman's* reagent. Anal. Biochem. 1968, 25, 192.

11. *Soli N.E., Froslie A.*: Chronic copper poisoning in sheep. I. The relationship of methemoglobinemia to Heinz body formation and haemolysis during the terminal crisis. Acta Pharmacol. Toxicol. 1972, 40, 169. – 12. *Szczepaniak S., Dudka J.*: Przydatność spektrofotometrycznej metody Messineo i Musarra do oznaczania wolnego tryptofanu w osoczu krwi. Roczn. PZH. 1993, 44, 191. – 13. *Tyburczyk W., Borkowska J., Podolak M.*: Badanie wpływu azotynu sodu na niektóre wskaźniki biochemiczne we krwi szczura. Roczn. PZH. 1987, 38, 287. – 14. *Tyburczyk W., Podolak-Majczak M.*: Wpływ skojarzonego działania azotynu sodowego i karbarylu na organizm szczura. Roczn. PZH. 1987, 38, 125. – 15. *Zatoński W.*: Niektóre zagadnienia metabolizmu krwinki czerwonej u ludzi z zawodową ekspozycją na działanie czynników szkodliwych. Pol. Tyg. Lek. 1978, 23, 697.

Dn. 1994.07.18

20-130 Lublin, ul. Dembowskiego 8/52