

JAROSŁAW DUDKA, STANISŁAW SZCZEPANIAK, BARBARA TOMASZEWSKA¹⁾

OCENA ŁĄCZNEGO WPŁYWU CHLORKU MIEDZIOWEGO I AZOTYNU SODU NA WYBRANE PARAMETRY BIOCHEMICZNE OSOCZA SZCZURÓW (NARAŻENIE SUBCHRONICZNE)

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF CUPRIC CHLORIDE AND SODIUM NITRITE ON SOME BLOOD PLASMA BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS (SUBCHRONIC EXPOSURE)

Z Katedry i Zakładu Chemii Toksykologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. *St. Szczepaniak*

¹⁾ Z Laboratorium Analitycznego Szpitala MSW w Lublinie

Kierownik: mgr *T. Herman*

Oznaczono aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AspAT), aminotransferazy alaninowej (AlAT), gamma-glutamylotransferazy (GGTP-azy) oraz poziom kreatyniny i mocznika w osoczu krwi szczurów otrzymujących przez 90 dni chlorek miedziowy (ok. 0,03 LD₅₀) i azotyn sodu (0,2 LD₅₀).

W grupie otrzymującej azotyn sodu stwierdzono zmiany poziomu mocznika i aktywności GGTP-azy.

Prezentowana praca jest kontynuacją badań łącznego oddziaływania miedzi i azotynu sodu na wybrane parametry biochemiczne osocza u szczurów [6].

Miedź jest pierwiastkiem śladowym, który w bardzo małych ilościach jest niezbędny dla ustroju. Przy wyższych poziomach pobrania może wykazywać, podobnie jak ołów, rtęć, kadm, cynk, mangan i wanad – działanie szkodliwe, w tym hepatotoksyczne i/lub nefrotoksyczne [2, 4, 11, 14, 18]. Przejawem takiego działania są zmiany w aktywnościach aminotransferazy asparaginianowej (EC. 2.6.1.1.) – AspAT, aminotransferazy alaninowej (EC. 2.6.1.2.) – AlAT oraz *gamma*-glutamylotransferazy (EC. 2.3.2.1.) – GGTP-azy, zarówno w samych narządach jak i w osoczu.

Celem niniejszych badań było uzyskanie informacji o łącznym wpływie chlorku miedziowego i azotynu sodu na aktywności AspAT, AlAT i GGTP-azy oraz na poziom kreatyniny i mocznika w osoczu krwi szczurów w doświadczeniu 90-dniowym.

Przy dobrze oznaczanych parametrów kierowano się tym, że zmiany w aktywności aminotransferaz oraz GGTP-azy mogą być podstawą do wnioskowania o stanie funkcjonalnym wątroby, a podwyższenie poziomu mocznika oraz obniżenie kreatyniny – o ewentualnym działaniu nefrotoksycznym badanych ksenobiotyków.

Wybór GGTP-azy był ponadto podyktowany jej oddziaływaniem na homeostazę glutationu, który odgrywa istotną rolę w procesach redox, w tym również w procesie redukcji methemoglobiny do hemoglobiny, co wiąże się z zagadnieniem omawianym w naszej poprzedniej [6] pracy.

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 wodą *ad libitum*.

Szczury kontrolne i badane otrzymywały *per os* odpowiednio wodę destylowaną lub badane związki w odstępach dobowych przez 90 dni. Zwierzęta podzielono na cztery grupy po 12 sztuk: I grupa otrzymywała azotyn sodowy w dawce 30 mg/kg m.c. × dzień (0,2 LD₅₀); II grupa – chlorek miedziowy w ilości 4,67 mg/kg m.c. × dzień (ok. 0,03 LD₅₀); III grupa – chlorek miedziowy i azotyn sodu w dawkach jak wyżej; IV grupa (kontrolna) otrzymywała wodę destylowaną.

Roztwory azotynu sodu, chlorku miedziowego i wodę destylowaną podawano szczurom doustnie w objętości 0,5 cm³/200 g. m.c.

W celu uniknięcia ewentualnej interakcji chemicznej między badanymi związkami (CuCl₂ i NaNO₂) w przewodzie pokarmowym szczurów, grupie III podawano roztwory chlorku miedziowego i azotynu sodu w odstępach czterech godzin.

Wszystkie oznaczenia wykonano w osoczu krwi na analizatorze biochemicznym COBAS MIRA S szwajcarskiej firmy *Hoffmann-La Roche*. Krew pobrano 24 godziny po ostatnim (dziewięćdziesiątym) podaniu badanych związków.

Pomiar aktywności aminotransferazy alaninowej wykonano metodą *Henley-Wróblewskiego* z uwzględnieniem zaleceń Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC) z 1980 r. [8], aminotransferazy asparaginianowej wg *Karmen* z późniejszymi modyfikacjami oraz uwzględnieniem zaleceń IFCC z 1978 [7].

Oznaczenia aktywności *gamma*-glutamylotransferazy wykonano posługując się metodą *Szasz* [13], używając jako substratu *L-gamma*-glutamilo-p-nitroanilidu w obecności glicyloglicyny. Poziom kreatyniny oznaczano wg *Larsen* [9], a mocznika metodą *Tiffany* [15]. Do oznaczania mocznika zastosowano gotowy zestaw odczynników firmy *Cormay*, a pozostałe parametry oznaczano używając zestawów firmy *Pointe Scientific Inc.*

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki oznaczeń badanych parametrów przedstawiono w tabelach I i II, podając przedziały ufności ($\bar{x} \pm t_p \bar{s}$) oraz istotności różnic między wartościami średnimi w grupach badanych a grupą kontrolną.

Tabela I. Aktywność (IU/dm³) aminotransferazy alaninowej (AlAT) i asparaginianowej (AspAT) oraz *gamma*-glutamylotransferazy (GGTP-azy) w osoczu krwi szczurów
The activity (IU/dm³) of alanine aminotransferase (AlAT), aspartate aminotransferase (AspAT) and *gamma*-glutamyltransferase (GGTP-azy) in blood plasma of rats

| Oznaczany parametr | Grupa badana | | | |
|--------------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|----------------------|
| | NaNO ₂ | CuCl ₂ | CuCl ₂ +NaNO ₂ | Kontrola |
| AlAT | 30,80 ± 3,78 n=10 | 28,44 ± 6,11 n=9 | 37,89 ± 5,35 n=9 | 32,67 ± 3,71 n=9 |
| AspAT | 66,10 ± 8,96 n=10 | 68,22 ± 8,18 n=9 | 71,80 ± 6,22 n=10 | 71,20 ± 5,24 n=10 |
| GGTP-aza | 2,88* ± 0,79 n=10 | 1,90 ± 0,59 n=10 | 1,59 ± 0,41 n=11 | 1,76 ± 0,40 n=12 |

* - p < 0,02

Wyniki dotyczące oznaczeń enzymatycznych (Tab. I.) wskazują, że grupy zwierząt otrzymujące pojedyncze ksenobiotyki, jak i narażone na ich łączne działanie nie wykazują zmian w aktywnościach badanych aminotransferaz.

W badaniach *Dróżdża i wsp.* [5], w których świnkom morskim podawano dwutlenek azotu, również nie stwierdzono istotnych zmian aktywności osoczowej ALAT, a aktywność AspAT była nieznacznie niższa w porównaniu z grupą kontrolną. W tej samej pracy stwierdzono wyraźne podwyższenie (ok. 30%) aktywności GGTP-azy. W niniejszej pracy wykazano również znamienne wzrost aktywności tego enzymu w grupie I., otrzymującej sam azotyn sodu, natomiast związek ten w obecności chlorku miedziowego (grupa III) nie wykazywał takich właściwości. Podobnie sam chlorek miedziowy nie spowodował zmian w aktywności GGTP-azy w porównaniu z grupą kontrolną.

Spostrzeżenie to jest o tyle interesujące, że istnieje wiele teoretycznych przesłanek świadczących o możliwości oddziaływania jonów Cu^{++} na przepuszczalność błony komórkowej. Zmiana przepuszczalności może więc być spowodowana bądź bezpośrednim łączeniem się metalu z grupami sulfhydrylowymi białek strukturalnych, bądź zakłóceniem równowagi oksydoredukcyjnej w komórce. Zakłócenie równowagi może być z kolei związane z syntezą rodników nadtlenkowych w obecności miedzi [1], łączeniem się miedzi ze zredukowanym glutationem [19] oraz utlenianiem przez miedź zredukowanej postaci NAD [3], który obok NADP jest koenzymem zapewniającym utrzymanie zredukowanego glutationu na odpowiednim poziomie [10].

W świetle powyższych faktów należałoby oczekiwać pojawienia się zmian aktywności badanych enzymów podczas narażenia szczurów na nadmiar jonów Cu^{++} . Zmiany te powinny się nasilać po wprowadzeniu dodatkowego ksenobiotyku w postaci azotynu sodu, który również może potencjalnie modyfikować przepuszczalność błony komórkowej poprzez zakłócenie równowagi redox w komórce [16, 17]. *Owczarek* [12] stwierdził istotne obniżenie GGTP-azy w osoczu szczurów otrzymujących przez 5 tygodni co 7 dni miedź w dawce 20 mg/kg m.c.

Nie można wykluczyć, że zaobserwowany w niniejszej pracy brak wpływu miedzi na aktywność badanych enzymów w osoczu, wynika z odmiennego sposobu dawkowania roztworu chlorku miedziowego, niż w doświadczeniach *Owczarka* [12].

Pozostaje niewyjaśniona przyczyna braku wpływu łącznego oddziaływania roztworów CuCl_2 na aktywność GGTP-azy w kontekście podwyższenia aktywności tego enzymu przez sam azotyn.

Tabela II. Poziom (mg/dl) kreatyniny i mocznika w osoczu krwi szczurów
The level (mg/dl) creatine and urea in blood plasma of rats

| Oznaczany parametr | Grupa badana | | | |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| | NaNO_2 | CuCl_2 | $\text{CuCl}_2 + \text{NaNO}_2$ | Kontrola |
| Kreatynina | $0,42 \pm 0,04$ n = 10 | $0,41 \pm 0,03$ n = 10 | $0,41 \pm 0,03$ n = 12 | $0,37 \pm 0,03$ n = 11 |
| Mocznik | $24,14^* \pm 3,76$ n = 11 | $27,97 \pm 5,23$ n = 11 | $31,00 \pm 2,35$ n = 10 | $29,96 \pm 2,77$ n = 9 |

* - $p < 0,02$

Podobne spostrzeżenie uzyskano w odniesieniu do poziomu mocznika (tabela II) oraz – w poprzedniej pracy [6] do poziomu methemoglobiny. Również i w tych przypadkach, w grupie otrzymującej sam azotyn sodu, stwierdzono znamienne różnice w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w grupie o łącznym narażeniu ($\text{CuCl}_2 + \text{NaNO}_2$) nie odnotowano takich zmian.

Na podstawie omówionych danych, wydaje się mało prawdopodobne antagonistyczne działanie pomiędzy chlorkiem miedziowym a azotynem sodu na poziomie biochemicznym. Wniosek taki nasuwa się wówczas, gdy uwzględni się odrębność przemian biochemicznych mocznika, GGTP-azy i methemoglobiny oraz ich zróżnicowanie topograficzne w organizmie. Bardziej wiarygodne wydaje się twierdzenie, że antagonizm ten ma charakter bezpośrednich oddziaływań chemicznych pomiędzy badanymi związkami.

W tabeli II przedstawiono wyniki, dotyczące poziomu kreatyniny i mocznika w osoczu krwi szczurów narażonych na poszczególne związki w porównaniu z grupą kontrolną. Wynika z niej, że stężenie kreatyniny nie ulega zmianie w żadnej z badanych grup.

Poziom mocznika jest istotnie niższy w grupie narażonej na działanie azotynu. Dane te wydają się sugerować, że w stosowanych warunkach doświadczenia żaden z badanych związków podawany oddzielnie oraz łącznie, nie zakłóca funkcji nerek. Obniżenie poziomu mocznika w wyniku długotrwałego narażenia na azotyn może wskazywać na upośledzenie procesów syntezy mocznika w wątrobie. Hipoteza ta, aczkolwiek znajduje pewne potwierdzenie w innych doświadczeniach [5], w których obserwowano obniżenie poziomu białka całkowitego pod wpływem dwutlenku azotu, wymaga jednak weryfikacji w dalszych badaniach, polegających na przesłedzeniu kształtowania się tych parametrów zarówno we krwi jak i moczu.

WNIOSKI

1. 90-dniowe narażenie szczurów na azotyn sodu powoduje wzrost aktywności *gamma*-glutamylotransferazy, co może świadczyć o toksycznym działaniu azotynu sodu na komórki wątroby.

2. Obniżenie poziomu mocznika w osoczu krwi szczurów otrzymujących azotyn sodu, sugeruje upośledzenie syntezy mocznika w wątrobie.

3. Stwierdzony wpływ azotynu sodu na poziom mocznika i aktywność *gamma*-glutamylotransferazy (grupa I) oraz brak tego działania w obecności chlorku miedziowego (grupa III), może świadczyć o interakcji chemicznej pomiędzy badanymi substancjami.

J. Dudka, St. Szczepaniak, B. Tomaszewska

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF CUPRIC CHLORIDE AND SODIUM NITRITE ON SOME BLOOD PLASMA BIOCHEMICAL PARAMETERS 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 LD₅₀); 2). – cupric chloride in dose 4,67 mg/kg b.w. \times day (0,03 LD₅₀); 3). – cupric chloride and sodium nitrite in amounts as above, and 4). – control group – received dest. water.

The activity of alanine aminotransferase (AlAT), aspartate aminotransferase (AspAT), *gamma*-glutamyltransferase (GGTP-ase) and creatinine and urea level in blood plasma were determined 24 hours after the last application of compounds.

There was showed, that every-day rats' intoxication with sodium nitrite during 90 days caused the significant increase of *gamma*-glutamyltransferase activity and decrease of urea level in the blood plasma.

Subchronic exposure to copper and copper with sodium nitrite causes no effect on biochemical parameters were studied.

PIŚMIENICTWO

1. *Calabrese E.J.*: Age and susceptibility to toxic substances. A. Wiley-Interscience Publication, New York, 1986, page 81.
2. *Cempel M.*: Interakcja kadm-kwas acetylosalicylowy w organizmie szczurów. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1988, 21, 151.
3. *Dobryczycka W., Owczarek H.*: Effects of lead, copper and zinc on the rat's lactate dehydrogenase *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 1981, 48, 21.
4. *Dobryczycka W., Owczarek H., Kulpa J., Łukasik-Lemańska K.*: Aktywność niektórych enzymów surowicy krwi szczura podczas podawania soli Pb, Cu i Zn i terapii D-penicylaminą. *Acta Polon. Pharm.* 1979, 36, 233.
5. *Dróżdż M., Luciak M., Kośmider S., Molska-Dróżdż T., Ludyga K., Pasiewicz J.*: Wpływ przewlekłego działania dwutlenku azotu na zaburzenia metaboliczne i zmiany histopatologiczne w wątrobie świnek morskich. *Med. Pracy.* 1975, 26, 157.
6. *Dudka J., Szczepaniak S.*: Ocena łącznego wpływu chlorku miedziowego i azotynu sodowego na poziom methemoglobiny i tryptofanu we krwi szczura (narażenie subchroniczne). *Roczn. PZH,* 1995, 46, 169.
7. Expert panel of enzymes of the International Federation of Clinical Chemistry. *Clin. Chem.* 1978, 24, 720.
8. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. *Clin. Chim. Acta.* 1980, 105, 145F.
9. *Larsen K.*: Creatinine assay by a reaction-kinetic principle. *Clin. Chim. Acta,* 1972, 41, 209.
10. *Misiewicz A.*: Zachowanie się zredukowanego glutationu i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w krwinkach czerwonych ludzi narażonych na zanieczyszczenia emitowane przez zakłady azotowe. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1978, 11, 373.
11. *Olczak G., Chmielnicka J.*: Biochemiczne wskaźniki toksycznego uszkodzenia nerek. *Med. Pracy,* 1981, 32, 213.
12. *Owczarek H.*: Wpływ metali ciężkich i D-penicylaminy na aktywność γ -glutamylotranspeptydazy surowicy krwi i nerek szczurów *in vivo* i *in vitro*. *Folia Medica Cracoviensia,* 1980, 22, 349.
13. *Szasz G.*: A Kinetic photometric method for serum γ -glutamyltranspeptidase. *Clin. Chem.* 1969, 15, 124.
14. *Szeliga-Cetnarska M., Zbrojkiewicz J.S.*: Przewlekłe zatrucie manganem. *Med. Pracy,* 1985, 36, 382.
15. *Tiffany T.O., Jansen J.M., Burtis C.A., et al.*: Enzymatic rate and end-point analysis of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer. *Clin. Chem.* 1972, 18, 829.
16. *Tyburczyk W., Borkowska J., Klimek K.*: Badania dynamiki zmian niektórych parametrów biochemicznych we krwi szczurów zatrutowanych azotynem sodu. *Roczn. PZH,* 1991, 42, 423.
17. *Tyburczyk W., Borkowska J., Klimek K., Galicki D.*: Wpływ skojarzonego działania azotynu sodu i fenitrotonu na wybrane parametry biochemiczne we krwi szczurów. *Roczn. PZH,* 1989, 40, 58.
18. *Wardas M., Dobryczycka W.*: Wpływ ostrego zatrucia solami Pb^{2+} na poziom białek ostrej fazy osocza krwi szczurów. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1984, 17, 149.
19. *Worowski K., Farbiszewski R., Mariak R.T.*: Biochemiczne mechanizmy detoksykacji. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1973, 6, 123.

Dn. 1994.11.10

20-130 Lublin, ul. Dembowskiego 8/52