

JAROSŁAW DUDKA, STANISŁAW SZCZEPANIAK, MAREK MAZUR¹

OCENA ŁĄCZNEGO WPŁYWU OŁOWIU I AZOTYNU SODOWEGO NA
 NIEKTÓRE PARAMETRY BIOCHEMICZNE WE KRWI SZCZURA
 W NARAŻENIU SUBCHRONICZNYM
 CZ. I. WPŁYW NA POZIOM METHEMOGLOBINY, GRUP
 SULFHYDRYLOWYCH I TRYPTOFANU

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF LEAD AND SODIUM NITRITE
 ON SOME BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS DURING
 SUBCHRONIC EXPOSURE
 PART I. INFLUENCE ON METHEMOGLOBIN, SULFHYDRYL GROUPS AND
 TRYPTOPHAN LEVELS

Katedra i Zakład Chemii Toksykologicznej
 Akademia Medyczna w Lublinie
 20-080 Lublin, ul. Radziwiłłowska 5

Kierownik: prof. dr hab. S. Szczepaniak

¹Laboratorium Analityczne Szpitala MSW w Lublinie

Kierownik: mgr T. Herman

Przedstawiono wyniki oznaczeń methemoglobiny u szczurów po 30, 45, 60, 75 i 90 dniach narażenia na octan ołowiu oraz azotyn sodu. Dodatkowo po 90 dniach zmierzono poziom hemoglobiny, pozabiałkowych grup – SH (w erytrocytach) oraz wolnego tryptofanu (w osoczu krwi). U szczurów otrzymujących ołów i azotyn pojedynczo, stwierdzono wzrost poziomu methemoglobiny przy równoczesnym spadku poziomu hemoglobiny, wolnych grup sulfhydrylowych oraz tryptofanu. Łącznie narażenie zwierząt na ołów i azotyn przez 90 dni nie prowadzi do zmiany w stężeniu methemoglobiny.

Cechą współczesnych zatruc środowiskowych jest ich kompleksowy charakter [22]. Ogromna różnorodność związków stwarza przy tym nieograniczone możliwości potencjalnego oddziaływania na procesy biochemiczne ustroju. W problematyce łącznego narażenia istotne znaczenie mają te ksenobiotyki, które stwarzają największe zagrożenia, zarówno ze względu na koncentrację w środowisku jak i zasięg ich oddziaływania na populację ludzi.

Zagrożenia wynikające z obecności ołowiu oraz azotynów są niekwestionowanie [13, 14, 15], dlatego wydawało się celowe podjęcie badań dotyczących analizy biochemicznych skutków równoczesnego narażenia organizmu na wymienione ksenobiotyki.

Mechanizm toksycznego oddziaływania ołowiu [11] i azotynów [19, 21] na erytrocyty został dobrze poznany i szeroko opisany, natomiast charakter ich toksykologicznej interakcji pozostaje problemem otwartym.

MATERIAŁ I METODYKA

Badania wykonano na czterdziestu ośmiu białych szczurach – samcach *Wistar*, otrzymanych z hodowli zwierząt laboratoryjnych w Brwinowie k. Warszawy. Zwierzętom o początkowej masie 220–250 g podawano paszę standardową LSM i wodę *ad libitum*. Szczury kontrolne badane otrzymywały sondę do żołądka odpowiednio – wodę destylowaną lub badane związki w odstępach dobowych przez 90 dni.

Zwierzęta podzielono na 4 grupy po 12 sztuk: I grupa (kontrolna) – otrzymywała wodę destylowaną; II grupa – azotyn sodu w dawce 30 mg/kg m.c. × dzień (20% LD₅₀); III grupa – octan ołowiu w dawce 10 mg/kg m.c. × dzień (6,7% LD₅₀) IV grupa – octan ołowiu i azotyn sodu w dawkach jak wyżej.

Wodę destylowaną oraz badane związki podawano szczurom w objętości 0,5 cm³/200 g m.c. Jedynie w grupie IV, aby nie przekroczyć dziennej objętości podawanych roztworów w stosunku do pozostałych grup, zwierzętom podawano (oddzielnie) Pb (CH₃COO)₂ i NaNO₂ o dwukrotnie wyższych stężeniach w objętości 0,25 cm³/200 g m.c.

W celu uniknięcia ewentualnej interakcji chemicznej w przewodzie pokarmowym szczurów, w grupie o narażeniu łącznym (Pb + NaNO₂) roztwory podawano w odstępach czterech godzin – przy czym jako pierwszą podawano zawsze sól metalu.

Oznaczenia methemoglobiny (Met-Hb) wykonywano każdorazowo przez pobranie krwi z ogona, 24 h po, 45, 60, 75 i 90 dniach narażenia. W ten sposób pobierano krew do badań hemoglobiny, które wykonano 24 po ostatnim – dziewięćdziesiątym podaniu związków. Następnie zwierzęta skrwawiono w słabej narkozie eterowej i oznaczono pozostałe parametry biochemiczne.

W pełnej krwi oznaczono poziom methemoglobiny metodą *Evelyna* i *Malloya* [7] oraz hemoglobiny wg *Drabkina* [1].

W osoczu określono poziom wolnego tryptofanu wg *Messineo* i *Musarry* [20], a w erytrocytach poziom wolnych grup sulfhydrylowych [6]. Poziom wolnych grup – SH badano na analizatorze biochemicznym Cobas Mira S szwajcarskiej firmy *Hoffmann – La Roche*. 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 poziomów methemoglobiny (w % całkowitej hemoglobiny) w poszczególnych okresach badawczych przedstawiono w tabeli I.

Poziom hemoglobiny (w g/100 cm³ krwi), wolnych grup sulfhydrylowych (wyrażonych w mmolach zredukowanego glutationu/dm³ erytrocytów) oraz wolnego tryptofanu (μmolach/dm³ osocza) przedstawiono w tabeli II.

W obydwu tabelach podano wartości średnie, przedziały ufności ($\bar{x} \pm t_0 \bar{s}$) oraz różnice statystycznie istotne w stosunku do poziomów kontrolnych.

Jak wynika z tabeli I poziom methemoglobiny we krwi szczurów narażonych na azotyn sodu (grupa II) wzrasta istotnie już od 30 dnia badań. W ostatnim 90 – tym dniu odnotowano ponad trzykrotny wzrost tego parametru w stosunku do grupy kontrolnej.

Effekt methemoglobinotwórczy octanu ołowiu zaobserwowano dopiero w 75 dniu narażenia, natomiast po 90 dniach wzrost ten był jeszcze bardziej istotny – przewyższający niemal 2,5 krotnie wartości uzyskane dla grupy kontrolnej.

U zwierząt, którym podawano octan ołowiu i azotyn sodu łącznie (grupa IV) nie stwierdzono różnic w stosunku do grupy kontrolnej w ciągu całego okresu badań.

Tabela I. Średnie wartości stężeń methemoglobiny (w % całkowitej hemoglobiny we krwi szczura podczas 90-dniowej intoksykacji)
The mean level of methemoglobin (in total hemoglobin %) in the rats blood during 90-days intoxication

Grupa badana	Okres intoksykacji (dni)				
	30	45	60	75	90
I (H ₂ O-kontrolna)	1,29 ± 0,32 n=9 ***	1,26 ± 0,83 n=9 *	1,52 ± 0,46 n=9 ***	1,36 ± 0,36 n=10 ***	1,24 ± 0,32 n=10 ***
II (NaNO ₂)	3,93 ± 1,33 n=11	2,44 ± 0,46 n=12	4,13 ± 1,06 n=10	4,69 ± 1,40 n=11	4,17 ± 1,01 n=9
III (Pb(CH ₃ COO) ₂)	1,61 ± 0,73 n=8	2,50 ± 1,10 n=12	2,23 ± 0,99 n=10	2,02 ± 0,29 n=11	3,02 ± 0,63 n=10
IV (Pb(CH ₃ COO) ₂ +NaNO ₂)	1,84 ± 0,88 n=8	1,95 ± 0,69 n=10	2,15 ± 0,71 n=11	1,59 ± 0,40 n=10	1,97 ± 0,74 n=9

Różnice istotne statystycznie w stosunku do poziomów kontrolnych:

*p<0,02 **p<0,01 ***p<0,001

Tabela II. Poziom hemoglobiny (g/100cm³ krwi), wolnych grup sulfhydrylowych (mmol glutationu/dm³ erytrocytów) oraz wolnego tryptofanu (μmol/dm³ osocza) u szczurów po 90 dniowej intoksykacji.
The levels of hemoglobin (g/100cm³ blood), free sulfhydryl groups (mmol glutathione/dm³ of erythrocytes) and free tryptophan (μmol/dm³ of plasma) in rats after 90-days intoxication

Grupa szczurów	Parametr biochemiczny		
	Hb	SH	TRP
I (H ₂ O-kontrola)	18,04 ± 0,61 n=10 *	1,12 ± 0,07 n=11 **	100,44 ± 6,78 n=9 **
II (NaNO ₂)	16,58 ± 0,86 n=10 **	0,75 ± 0,06 n=12 **	86,13 ± 2,81 n=11 *
III (Pb(CH ₃ COO) ₂)	15,94 ± 0,99 n=10 **	0,84 ± 0,11 n=11	88,68 ± 5,00 n=10
IV(Pb(CH ₃ COO) ₂ + NaNO ₂)	16,39 ± 0,55 n=9	1,03 ± 0,09 n=11	91,82 ± 7,31 n=9

Różnice istotne statystyczne w stosunku do poziomów kontrolnych:

*p < 0,01, **p < 0,001

Poziom hemoglobiny (tab. II.) był obniżony o około 8% w grupie otrzymującej azotyn sodu, o 11% u zwierząt otrzymujących octan ołowiu oraz o około 9% u zwierząt narażonych łącznie na obydwie substancje.

Nie zmieniło się stężenie grup sulfhydrylowych w erytrocytach zwierząt otrzymujących łącznie $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ i NaNO_2 , natomiast w pozostałych grupach odnotowano istotne obniżenie wartości tego parametru. W grupie II (NaNO_2) spadek ten wynosił 33%, a w grupie III ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) – 25%.

Stężenie wolnego tryptofanu w osoczu obniżyło się o około 14% w grupie zwierząt otrzymującej azotyn i o 12% w grupie zwierząt narażonej na ołów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Głównym kierunkiem toksycznego działania azotynów na organizm jest proces przekształcania hemoglobiny w methemoglobinę. Z badań ostatnich lat [19, 21] wynika, że utlenianie Fe^{2+} do Fe^{3+} przez azotyny jest możliwe, nie tylko w sposób bezpośredni. Podczas utleniania hemoglobiny dochodzi także do uwalniania wolnych rodników i aktywnych form tlenu, które mogą również utleniać żelazo z Fe^{2+} do Fe^{3+} .

W niniejszych badaniach stwierdzono, że azotyn sodu powoduje statystycznie istotny wzrost poziomu Met-Hb u zwierząt począwszy od 30 dnia narażenia. Świadczy to o wyraźnym methemoglobinotwórczym działaniu tego związku w warunkach niniejszego eksperymentu. Stężenia Met-Hb (4,17%) po 90-dniowym podawaniu azotynu jest bardzo zbliżone do wyników uzyskanych przez *Podolak-Majczak*, która w podobnych warunkach, stosując dawkę 20 mg NaNO_2/kg m.c. otrzymała średnią wartość tego parametru równą 4,20% [16].

Badania dotyczące toksycznego oddziaływania ołowiu na organizm, koncentrują się głównie na zaburzeniach w syntezie hemoglobiny. Pojawiają się jednak doniesienia o możliwości utlenienia hemoglobiny do methemoglobiny przez ten pierwiastek. Prawdopodobnie proces ten zachodzi w erytrocycie na drodze pośredniej, stymulowany wytwarzaniem aktywnych form tlenu [10] o silnych właściwościach utleniających.

W zatruciu ołowiem obserwuje się również podwyższony poziom HbF [13] (bardziej podatnej na utlenianie niż HbA [14]). Udowodniono także wpływ tego metalu na aktywność wielu enzymów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi redox w komórce: reduktazy methemoglobiny [18], reduktazy glutationowej, dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej [9], katalazy [18] oraz dehydrogenazy mleczanowej [4] i dysmutazy ponadtlenkowej [2].

Analizując przedstawione wyniki można zauważyć, że w grupie otrzymującej octan ołowiu występuje wyraźna tendencja do wzrostu stężenia methemoglobiny począwszy od 30 dnia narażenia. Jednak dopiero w 75 i 90 dniu obserwuje się statystycznie istotne podwyższenie stężenia tego parametru.

U zwierząt otrzymujących równocześnie ołów i azotyn przez 90 dni, nie zaobserwowano zmian w stężeniu Met-Hb, w stosunku do grupy kontrolnej. Może to świadczyć o antagonistycznym działaniu obu podawanych związków. Trudno jest jednak określić charakter tego antagonizmu na tym etapie badań.

Porównując wartości Met-Hb uzyskane w grupie poddanej łącznemu działaniu ołowiu i azotynu z pozostałymi grupami, można wnioskować, że ołów wyraźnie obniża działanie methemoglobinotwórcze azotynu. Podobne efekty zauważono w badaniach dotyczących równoczesnego oddziaływania jonów Cu^{2+} i NaNO_2 na methemoglobinę u szczura [5].

Poziom hemoglobiny w grupie zwierząt narażonych na azotyn jest istotnie niższy w stosunku do grupy kontrolnej. Obserwowaną niedokrwistość można tłumaczyć zaburzeniami biosyntezy hemu. Jeden z jej etapów – dekarboksylacja kwasu *delta* amino – *beta* – ketoadypinowego do kwasu *delta* aminolewulinowego jest katalizowana przez fosfopirydoksal (witamina B₆). Według *Lhuissier* [12] azotyny wywołują destrukcję witamin z grupy B. Bardziej istotne obniżenie poziomu Hb odnotowano w grupie szczurów otrzymujących sam związek ołowiu. Jest to typowa reakcja organizmu w zatruciach tym metalem.

W prezentowanym doświadczeniu stwierdzono istotne obniżenie poziomu niebiałkowych grup sulfhydrylowych zarówno u zwierząt otrzymujących octan ołowiu jak i azotyn pojedynczo. W większości komórek ssaków siarka glutationu stanowi ponad 90% siarki niebiałkowej [3], można zatem stwierdzić, że obniżenie zawartości niebiałkowych grup -SH może być utożsamiane z obniżeniem poziomu zredukowanego glutationu (GSH), wykorzystywanego między innymi do redukcji methemoglobiny [8]. Obniżenie stężenia GSH po 90 dniach narażenia szczurów na azotyn sodu oraz octan ołowiu (podawanych pojedynczo) może świadczyć o obronie organizmu polegającej na udziale GSH w procesie redukcji methemoglobiny. Wzrost poziomu methemoglobiny, obserwowany w obydwu grupach byłby prawdopodobnie większy w przypadku braku mechanizmu redukcji. Można również założyć, że w erytrocycie narażonym na te związki, bardziej uprzywilejowane jest wykorzystywanie NADPH przez reduktazę methemoglobiny niż przez reduktazę glutationu.

Sumowanie powyższych mechanizmów – udział GSH w redukcji methemoglobiny oraz zmniejszona wydajność redukcji glutationu prowadzi w konsekwencji do istotnego obniżenia zredukowanego glutationu. U szczurów narażonych na ołów, obniżenie wolnych grup – SH może wynikać dodatkowo z bezpośredniego łączenia się ołowiu z tymi grupami.

W łącznym oddziaływaniu ołowiu i azotynów na grupy sulfhydrylowe w erytrocytach, daje się zauważyć objawy efektu antagonistycznego, ponieważ stężenie ich w porównaniu do zwierząt otrzymujących badane związki pojedynczo jest wyraźnie podwyższone i nie różni się istotnie od poziomu w grupie kontrolnej.

Wolny tryptofan osocza obniżył się istotnie u zwierząt otrzymujących azotyn i octan ołowiu jednocześnie, u których stwierdzono wysoce znamienne wzrost poziomu methemoglobiny. Prawdopodobnie taka reakcja organizmu może być spowodowana zwiększonym zapotrzebowaniem erytrocytu na ten aminokwas. Tryptofan bowiem, przekształcony w kwas nikotynowy, jest wykorzystywany do syntezy nukleotydów – NAD i NADP, niezbędnych w reakcjach enzymatycznych redukcji methemoglobiny do hemoglobiny.

WNIOSKI

1. Wzrost poziomu methemoglobiny oraz jednoczesny spadek stężenia grup sulfhydrylowych i tryptofanu obserwowany w subchronicznym zatruciu szczurów zarówno ołowiem jak i azotynem może świadczyć o ich destrukcyjnym oddziaływaniu na mechanizmy chroniące hemoglobinę przed utlenianiem.

2. Łączne 90-dniowe narażenie szczurów na azotyn i ołów nie wpływa na zmianę methemoglobiny, pozabiałkowych grup sulfhydrylowych oraz wolnego tryptofanu. Fakt

ten w kontekście wysoce znamienych zmian stężeń w grupach narażonych na pojedyncze działanie $Pb(CH_3COO)_2$ i $NaNO_2$ świadczy o antagonistycznym działaniu podawanych związków w stosunku do wymienionych parametrów biochemicznych.

J. Dudka, St. Szczepaniak, M. Mazur

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF LEAD AND SODIUM NITRITE ON SOME BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS DURING SUBCHRONIC EXPOSURE

PART I. INFLUENCE ON METHEMOGLOBIN, SULFHYDRYL GROUPS AND TRYPTOPHAN LEVELS

Summary

The study was performed on 4 groups of male *Wistar* rats, receiving p.o. through 3 months every day: 1) dest. water (control group); 2) sodium nitrite in dose 30 mg/kg b.w. \times day (20% LD₅₀); 3) lead acetate in dose 10 mg/kg b.w. \times day (6,7% LD₅₀); 4) lead acetate and sodium nitrite in amounts as above.

The methemoglobin and hemoglobin were determined in whole blood, tryptophan – in plasma and free sulfhydryl groups – in erythrocytes.

There was shown methemoglobin creative effects by nitrite (4,17%) and lead (3,02%) after 90-days intoxication.

Both nitrite and lead significantly decrease free sulfhydryl groups and tryptophan levels in blood.

There was also observed that lead administrated together with sodium nitrite does not increase methemoglobin concentration.

PIŚMIENNICTWO

1. *Angielski S.*: Biochemia kliniczna i analityka. PZWL Warszawa 1985, 672. – 2. *Augusta A.* and all: Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986, 82, 512. – 3. *Bartosz G.*: Metabolizm glutationu. *Post. Biochem.* 1993, 39, 32. – 4. *Dobryszczyka W., Owczarek H., Kulpa J., Łukasik-Lemańska K.*: Aktywność niektórych enzymów surowicy krwi szczura podczas podawania soli Pb, Cu, Zn i terapii D-penicylaminą. *Acta Polon. Pharm.* 1979, 36, 232. – 5. *Dudka J., Szczepaniak S.*: Ocena łącznego wpływu chlorku miedziowego i azotynu sodu na poziom methemoglobiny i tryptofanu we krwi szczura (narażenie subchroniczne). *Roczn. PZH.* 1995, 46, 169. – 6. *Ellman G.L.*: Tissue sulfhydryl groups, *Archiv. Biochem. Biophys.* 1959, 82, 70. – 7. *Evelyn K.A., Malloy H.T.*: Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.* 1938, 126, 655. – 8. *Hłyńczak A.J., Sysa J.*: Methemoglobina i jej redukcja w krwinkach czerwonych. *Post. Biochem.* 1968, 14, 65. – 9. *Howard J.K.*: Human erythrocyte glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in normal subjects and in persons exposed to lead. *Clin. Sc. Md. Med.* 1974, 47, 515. – 10. *Jendryczko A.*: Udział wolnych rodników w zatruciu ołowiem. *Med. Pr.* 1994, 45, 171.

11. *Kuliczkowski K.*: Działanie ołowiu na układ czerwonekrwinkowy. *Med. Pr.* 1980, 31, 483. – 12. *Lhuissier A.*: *Ann. Nutr. Aliment.* 1976, 30, 847. – 13. *Lisiewicz J., Moszczyński P.*: Hematologia przemysłowa. PZWL Warszawa 1987, 113–132. – 14. Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej: Azotany, azotyny i związki N-nitrozowe. Kryteria zdrowotne środowiska, T. 5, PZWL Warszawa 1986. – 15. Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej: Ołów. Kryteria zdrowotne środowiska, T. 3, PZWL Warszawa 1982. – 16. *Podolak-Majczak M., Tyburczyk W.*: Wpływ skojarzonego działania azotynu sodu i karbarylu na organizm szczura. *Cz. II Methemoglobinemia.* *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1984, 17, 211. – 17. *Ribarov S., Benov L.*: Effects of the ions

of some heavy metals on the activity of the methemoglobin reductase. *Sci. Works. Higher Med. Int. Pleve*, 1982, 4, 56., – 18. *Sroczyński J., Jonderko G.*: Katalaza krwinek czerwonych w przewlekłej ołowicy u królików. *Post. Hig. Dośw.* 1963, 17, 609. – 19. *Stepuro I., Chaikovskaya N., Piletskaya T., Solodunov A.*: Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin. *Pol. J. Pharmacol.* 1994, 46, 601. – 20. *Szczepaniak S., Dudka J.*: Przydatność spektrofotometrycznej metody *Messineo* i *Musarra* do oznaczeń wolnego tryptofanu w osoczu krwi. *Roczn. PZH.* 1993, 44, 191.

21. *Tyburczyk W., Borkowska J., Klimek K.*: Badanie dynamiki zmian niektórych parametrów biochemicznych we krwi szczurów zatrutych azotynem sodu. *Roczn. PZH.* 1991, 42, 423. – 22. *Wysocka-Paruszevska B.*: Znaczenie toksykologiczne i kierunki łącznego działania pestycydów. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1984, 17, 135.

Otrzymano: 1996.08.19