

ANNA ŁUKASZEWICZ-HUSSAIN, JANINA MONIUSZKO-JAKONIUK

WPŁYW ZATRUCIA OSTREGO CHLORFENWINFOSEM NA AKTYWNOŚĆ
ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH ORAZ STĘŻENIE DIALDEHYDU
MALONOWEGO U SZCZURÓW

EFFECT OF ACUTE INTOXICATION WITH CHLORFENVINPHOS ON ACTIVITY
OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND CONCENTRATION OF MALONDIALDEHYD
IN RATS

Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna w Białymstoku

Białystok, ul. Mickiewicza 2c

Kierownik: prof. dr hab. J. Moniuszko-Jakoniuk

Zbadano wpływ podania chlorfenwinfosu w jednorazowej dużej dawce na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i stężenie dialdehydu malonowego we krwi szczurów.

WSTĘP

Chlorfenwinfos należy do grupy insektycydów fosforoorganicznych, związków szeroko stosowanych w rolnictwie.

Główny mechanizm działania związków fosforoorganicznych polega na hamowaniu aktywności acetylocholinoesterazy (AChE), cholinoestrazy niespecyficznej (ChE), w wyniku czego dochodzi do kumulacji acetylocholiny w tkankach (ACh) i zaburzenia procesów fizjologicznych [5, 8, 9, 10].

W zatruciu chlorfenwinfosem dochodzi też, wskutek niedotlenienia, do uszkodzenia wielu tkanek i narządów, w tym wątroby [5, 9, 10]. We krwi obserwuje się kwasicę mleczanową (w 1 i 24h) charakterystyczną przy ostrym tkankowym niedoborze tlenu [10].

Celem pracy było sprawdzenie, czy w uszkodzeniu tkanek mają swój udział wolne rodniki i następowa peroksydacja lipidów występująca jako skutek reoksydacji tkanek. W pierwszym etapie badań oceniano aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenie dialdehydu malonowego we krwi.

MATERIAŁY I METODYKA

Badania wykonano na szczurach samcach rasy *Wistar* o masie ciała 200-230 g. Szczurom podawano ciepły roztwór olejowy chlorfenwinfosu w dawce $1/2$ LD₅₀, sondą do żołądka, a grupie kontrolnej równoważną objętość oleju. Materiał do badań - krew z serca pobierano w 1, 24 i 48 h po zatruciu.

Wykonano oznaczenia aktywności następujących enzymów:

- dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w erytrocytach przy użyciu gotowych zestawów firmy Randox,

- peroksydazy glutatynowej (GPX) w erytrocytach przy użyciu zestawu firmy Randox,
- reduktazy glutatynowej (GR) w erytrocytach przy użyciu przy użyciu gotowych zestawów firmy Randox,
- katalazy (CAT) we krwi metodą wg *Aebi* [2].

Ponadto w surowicy oznaczono stężenie dialdehydu malonowego wg metody *Buege i Aust* [3] oraz glukozy-6-fosforo dehydrogenazy (G-6-P.-DH) gotowym zestawem firmy Randox.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu *t-Studenta* za istotnie statystycznie przyjmując wartości różniące się przy $< 0,05$.

WYNIKI

W niniejszej pracy stwierdzono wzrost aktywności CAT w krwinkach czerwonych zwierząt otrzymujących chlorfenwinfos. Aktywność SOD wzrastała w 24h po intoksykacji, a obniżała się w 48h istotnie statystycznie w stosunku do kontroli, jak i pozostałych badanych grup. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian aktywności GPX. Aktywność GR obniżała się natomiast istotnie statystycznie w stosunku do wartości grupy kontrolnej jedynie w 48h zatrucia.

Aktywność G-6-P-DH w surowicy wzrastała istotnie statystycznie w stosunku do kontroli w 24 i 48 h po zatruciu chlorfenwinfosem.

Jako wskaźnik procesu peroksydacji lipidów oznaczono stężenie MDA w surowicy i stwierdzono, obniżenie jego stężenia w 1 h i 24 h po podaniu chlorfenwinfosu. W 48 h stężenie jego wracało do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej.

Tabela I. Zmiany badanych parametrów we krwi w zatruciu chlorfenwinfosem. Changes of antioxidant enzymes activity and MDA concentration in blood after chlorfenwinphos intoxication.

	kontrola	1 h	0,5 LD ₅₀ 24 h	48 h
CAT (mmol/L)	113,80 ± 9,27 n = 11	166,78 ± 34,07* n = 8	186,71 ± 42,44* n = 8	153,81 ± 16,41* n = 7
SOD (U/ml)	247,19 ± 24,01 n = 6	241,26 ± 40,14 n = 7	276,71 ± 23,37* n = 8	187 ± 28,74* ^o n = 5
GR (U/L)	29,74 ± 5,30 n = 10	26,34 ± 3,00 n = 7	30,33 ± 6,32 n = 6	17,34 ± 6,21* ^o n = 6
GPX (U/L)	685,91 ± 101,79 n = 9	777,41 ± 198,45 n = 6	586,32 ± 197,80 n = 5	576,22 ± 106,11 n = 6
G-6-P.-DH (U/L)	29,81 ± 6,642 n = 6	44,94 ± 18,7 n = 5	64,20 ± 14,68* n = 6	54,22 ± 10,32* n = 5
MDA (μmol/L)	3,12 ± 0,66 n = 11	1,95 ± 0,56* n = 11	2,27 ± 0,45* n = 9	3,86 ± 1,08* ^o n = 8

* – istotne statystycznie do kontroli (1).

o – istotne statystycznie do grup 2,3.

DYSKUSJA

W ostrym zatruciu dużą dawką chlorfenwinfosu stwierdzono zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych, jak i stężen MDA we krwi zatrutowanych szczurów.

Z wcześniejszych badań wynika, że w ostrym zatruciu tym związkiem dochodzi do uszkodzenia wątroby będącego wynikiem niedotlenienia [9, 10]. We krwi obserwowano kwasinę mleczanową w 1 i 24 h zatrucia oraz znaczny wzrost stężenia glukozy utrzymujący się do 48 h po zatruciu chlorfenwinforem w dawce $1/2$ LD₅₀ [10].

Występujące niedotlenienie i ponowna reoksydacja tkanek może być źródłem wolnych rodników.

W niniejszej pracy stwierdzono obniżenie stężenia MDA – czułego wskaźnika peroksydacji lipidów – w 1 h i 24 h doświadczenia, w 48 h natomiast wartość tego parametru wracała do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej. Obniżenie stężenia dialdehydu malonowego w pierwszym okresie po zatruciu związana jest jak się wydaje z występującym w tym okresie ostrym niedotlenieniem.

Chlorfenwinfos powodował wzrost aktywności SOD w 24 h, a obniżenie jej aktywności w 48 h doświadczenia.

Uważa się, że wzrost syntezy i aktywności SOD występuje przy hipoksji [14] co dodatkowo potwierdza obserwacje dotyczące zahamowania MDA we krwi. Mechanizm katalizy przeprowadzonej przez SOD sugeruje, że enzym ten jest niekompletnym antyoksydantem, zapobiegającym działaniu wolnego rodnika tlenowego (O₂), a biologicznie jego działanie poprzez H₂O₂ związane jest z działaniem katalazy [6, 13]. W niniejszych badaniach obserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności katalazy w stosunku do wartości grupy kontrolowanej w całym okresie doświadczenia. Najwyższą aktywność obserwowano w 24 h, a w 8 h aktywność tego enzymu była niższa niż w początkowym okresie eksperymentu, jednakże zmiany te nie miały cech istotności statystycznej. Funkcją katalazy jest usuwanie H₂O₂, powstałego w wyniku badań dehydrogenaz tlenowych. Z danych literaturowych wynika, że obecność H₂O₂ hamuje aktywność dysmutazy, a obecność O₂ hamuje działanie katalazy [6, 7] Pigeolet i wsp. [12] stwierdził, że może dochodzić do inaktywacji SOD, CAT, GPX przez produkty ich własnych reakcji w obecności wysokich stężeń nadtlenu wodoru czy rodnika hydroksylowego.

Wydaje się, że tym zjawiskiem można tłumaczyć uzyskanie w niniejszej pracy zmiany aktywności SOD i CAT. W wyniku niedotlenienia dochodzi do wzrostu aktywności SOD (24 h) co prowadzi do wzrostu stężenia nadtlenu wodoru. Rodnik ten nie jest wystarczająco wydajnie usuwalny przez katalazę, a to prowadzi do zahamowania aktywności SOD w 48 h. W wyniku tego procesu może dochodzić do nagromadzenia O₂, co daje obniżenie aktywności katalazy w 48 h doświadczenia.

Enzymem odpowiedzialnym za rozkład nadtlenu lipidów jest GPX. Enzym ten chroni błony komórkowe przed uszkodzeniem peroksydacyjnym. Chow i Tappel [4] sugerują, że aktywność GPX powiązana jest z aktywnością G-6-P-DH w przeciwdziałaniu peroksydacyjnemu uszkodzeniu tkanek przez oksydanty. GPX przekształca toksyczne nadtenki lipidów do alkoholi lipidowych wykorzystując równoważniki redukcyjne generowane przez G-6-P-DH. W reakcjach katalizowanych przez peroksydazę glutationową w końcowym etapie dochodzi do odłączenia cząsteczki utlenionego glutationu.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że w surowicy krwi istotnie statystycznie wzrasta aktywność G-6-P-DH w 24 i 48 h po intoksykacji, natomiast aktywność GPX nie zmieniała się istotnie statystycznie. Aktywność innego badanego

enzymu GR – enzymu odpowiedzialnego za przejście glutationu utlenionego do formy zredukowanej (GSH) obniżała się. Spadek stężenia formy zredukowanej GSH prowadzi do szybkiej kumulacji nadtlenków lipidów w komórce [13].

Uzyskane wyniki trudno jest porównać z danymi literaturowymi, gdyż prac dotyczących zachowania enzymów antyoksydacyjnych w zatruciu insekcydami fosforoorganicznymi jest bardzo niewiele. *Kalski* i wsp. [5] nie stwierdził zmian aktywności SOD we krwi w 1 i 24 h po zatruciu somanem, natomiast inny autor stwierdził jej obniżenie pod wpływem insekcydu fosforoorganicznego [1].

Podsumowując należy stwierdzić, że obserwowane zmiany aktywności enzymów i stężeń MDA we krwi potwierdzają z jednej strony niedotlenienie występujące do 24 h po zatruciu, z drugiej zaś mogą świadczyć o reoksydacji w późniejszym okresie po intoksykacji.

Proces reoksydacji przywracający właściwy metabolizm tlenowy po okresie niedotlenienia może prowadzić do dalszych uszkodzeń [13]. Mogą o tym świadczyć uzyskane wyniki – wzrost stężenia MDA czy obniżenie stężenia reduktazy glutationowej.

A. Łukasiewicz-Hussain, J. Moniuszko-Jakoniuk

EFFECT OF ACUTE INTOXICATION WITH CHLORFENVINPHOS ON ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND CONCENTRATION OF MALONDIALDEHYD IN RATS

Summary

The aim of this paper was examination of the influence of chlorfenvinphos on the activity of an antioxidant enzymes in the blood and concentration of the serum malonondialdehyd in rats.

It were found increase of the activity of SOD in 24 h and decrease in the 48 h; increase CAT activity, decrease GR activity in the 48 h and increase of G-6-P-DH activity in the 24 and 48 h after intoxication. Activity of GPX did not change statistically significant. It was observed decrease of MDA concentration in the serum in 1 and 24 h after intoxication and return to value in the control groups in the 48 h.

It can be concluded that the changes of the activity of enzymes and concentration of MDA in the blood indicates hypoxia in the first period of intoxication (to 24 h) and reoxidation process in the later period.

PIŚMIENICTWO

1. *Adamski Z., Ziemiński K., Lesicki A., Czerniewski E.*: Wpływ fenitrotonu na aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych podczas rozwoju larwalnego *Spodoptea exigna* Hubner. *Pestycydy*, 1996, 4, 31–21.
2. *Aebi H.E.*: *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie. 1983, 3, 273.
3. *Buege J.A. and Aust S.*: *Methods Enzymologic* 1978, 5, 52, 02.
4. *Chow C.K., Tappel A.L.*: An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lung of ozone – exposed rats. *Lipids* 1972, 7, 518–523.
5. *Kalski A., Ścianowski J.*, *Smok*: oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, stężenie diadehydu malonowego we krwi i narządach wewnętrznych szczurów zatrutych somanem. XVII Naukowy zjazd P.T. Farmaceutycznego. Kraków, wrzesień 1998, 181.
6. *Kono Y., Fridovich J.*: Superoxide radicals inhibits catalase. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 5751–5754.

7. *Laszlo A., Matkovits B., Varge Sz. J., Wittman T., Fazekas T.*: Changes in lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of human red blood cells after myocardial infarction. *Clin. Chim. Akta* 1991, 203, 413–41b.
8. *Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J.*: Zmiany aktywności aminotransferaz w surowicy krwi i frakcjach homogenatu wątroby w zatruciu chlorfenwinfosem. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1996, 29, 279–281.
9. *Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J.*: Procesy glikolityczne w wątrobie szczura w zatruciu chlorfenwinfosem. *Med. Pracy* 1997, 5, 579.
10. *Łukaszewicz-Hussain A., Chyczewski L., Moniuszko-Jakoniuk J.*: Stężenie mleczanów i glukozy w surowicy krwi oraz glikogenu w wątrobie w ostrym zatruciu chlorfenwinfosem. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1998, 31, 251–258.
11. *Panganmaia R.V., Miler I.S., Shanma H.M., Ahrens P.A., Canary J.J.*: Differential inhibitory effect of vitamin E and other antioxidants on prostaglandin synthetase platelet aggregation and lipoxydase. *Prostaglandis* 1977, 14, 261–271.
12. *Pigeolet E., Corblsier., Houbion A.*: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanism of Ageing and Development* 1990, 51–283–297.
13. *Skłodowska M.*: Antyoksydacyjna obrona organizmu na podstawie enzymatycznych i nieenzymatycznych składników krwi. *Badania epidemiologiczne regionu łódzkiego. Uniwersytet Łódzki – Łódź* 1997.
14. *Tsan M.F.*: Superoxidase dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *P.S.E.B.M* 1993, 203, 286–290.

Otrzymano: 1998.12.04