

ANNA ŁUKASZEWICZ-HUSSAIN, JANINA MONIUSZKO-JAKONIUK

OCENA AKTYWNOŚCI GAMMA-GLUTAMYLOTRANSFERAZY
I STĘŻENIA GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO W WĄTROBIE
SZCZURA W OSTRYM ZATRUCIU CHLORFENWINFOSEM

ESTIMATION OF LIVER GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE ACTIVITY AND
REDUCED GLUTATHIONE CONCENTRATION IN RATS IN ACUTE POISONING
WITH CHLORFENVINPHOS

Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna w Białymstoku
15–222 Białystok, ul. Mickiewicza 2c
Kierownik: prof. dr hab. J. Moniuszko-Jakoniuk

Zbadano wpływ podania chlorfenwinfosu w dawkach jednorazowych 0,1 LD₅₀ i 0,5 LD₅₀ na aktywność *gamma*-glutamylotransferazy i stężenie glutationu zredukowanego w wątrobie szczurów. Stwierdzono wzrost aktywności *g*-glutamylotransferazy w wątrobie szczurów otrzymujących chlorfenwinfos, istotny statystycznie do kontroli w 48 godz. po podaniu insektycydu w dawce wynoszącej 0,1 LD₅₀ oraz w 1, 24 i 48 godzinie po podaniu w dawce wynoszącej 0,5 LD₅₀. Zanotowano wzrost stężenia glutationu zredukowanego w zatruciu chlorfenwinfosem, istotny statystycznie do kontroli, w całym badanym okresie po podaniu insektycydu w dawce niższej, a także w 24 godzinie, po podaniu związku w dawce wyższej.

WSTĘP

Głównym mechanizmem toksycznego działania insektycydów fosforoorganicznych jest hamowanie acetylocholinoesterazy i objawy zatrucia ostrego tymi związkami, związane są przede wszystkim z tym mechanizmem [3, 4, 19]. Jednakże insektycydy te cechują się wielokierunkowym działaniem, a między innymi prowadzą do zaburzeń funkcji wątroby [3, 4, 7, 12]. Mechanizm tych zaburzeń, mimo wieloletnich badań, pozostaje niewyjaśniony w pełni.

Enzymem wskaźnikowym przy określeniu stopnia uszkodzenia wątroby, wskutek działania różnych ksenobiotyków jest *gamma*-glutamylotransferaza (GGT, E.C.2.3.2.2) [5, 6, 23, 24]. Jest to enzym zlokalizowany głównie w błonach komórkowych, skąd przy uszkodzeniu narządu łatwo przechodzi do krwi [6, 23, 24]. Niektórzy autorzy uważają, że wzrost aktywności GGT w surowicy jest jednym z najwcześniejszych wskaźników zaburzeń strukturalno-czynnościowych w wątrobie [23, 24]. GGT jest też enzymem odpowiedzialnym za rozkład glutationu, którego zredukowana forma (GSH), pełni funkcję kluczowego nieenzymatycznego przeciwutleniacza [18].

Chlorfenwinfos – O,O-dietylofosforan 1-(2,4-dichlorofenylo)-2-chlorowinyłu jest insektycydem fosforoorganicznym, produkcji polskiej, który występuje jako substancja

biologicznie aktywna, w szeregu środkach ochrony roślin oraz w preparatach wieloskładnikowych [12, 13]. Pozostałości tego insektycydu znajdowano w żywności [8]. Zaburzenia funkcji wątroby obserwowano u robotników rolnych pracujących w kontakcie ze związkami fosforoorganicznymi, jak i u osób pracujących przy ich produkcji (w tym chlorfenwinfosu), nawet gdy nie były przekroczone NDS na stanowisku pracy [2, 7].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu ostrego zatrucia chlorfenwinfosem na aktywność *gamma*-glutamylotransferazy oraz stężenie glutationu zredukowanego w wątrobie zwierząt doświadczalnych.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na szczurach samcach, rasy Wistar pochodzących z hodowli własnej. Szczury bytowały w warunkach standardowych, przewidzianych dla zwierzętarni i otrzymywały paszę granulowaną oraz wodę *ad libitum*. Badania wykonano na dorosłych osobnikach o masie ciała 180–230g. Zwierzęta podzielono na trzy grupy: jedną grupę stanowiły zwierzęta kontrolne, pozostałe dwie grupy badane otrzymywały chlorfenwinfos w dawce wynoszącej odpowiednio 0,1 i 0,5 wartości LD₅₀.

Chlorfenwinfos (98%) otrzymano z Instytutu Przemysłu Organicznego w Warszawie. Wartość LD₅₀ – 15mg/kg m.c. przyjęto na podstawie danych z piśmiennictwa [12], jak też potwierdzono w badaniach własnych.

Materiał biologiczny do badań – skrawek wątroby, pobierano w narkozie eterowej w 1, 24 i 48 godzinie po zatruciu. Wątrobę płukano w roztworze soli fizjologicznej i przygotowywano 10% homogenat w buforze Tris-HCl o pH 7,4, z dodatkiem 0,25 M sacharozy, 2 mM EDTA. Uzyskiwany w ten sposób homogenat wirowano 20 minut przy obrotach 8500 g. W otrzymanym supernatancie oznaczano aktywność GGT przy użyciu gotowych zestawów produkcji LaChema, Czechy. Zasada metody opiera się na fotometrycznym pomiarze stężenia uwolnionej 4-nitroaniliny. Stężenie to jest proporcjonalne do aktywności GGT.

W supernatancie homogenatu wątroby oznaczano białko metodą *Lowry* [11], celem przeliczenia jednostek aktywności enzymatycznej na gram białka.

Skrawki wątroby do oznaczania glutationu zredukowanego homogenizowano w 5% kwasie metafosforowym, wirowano 3000g, 10 minut. Oznaczenia wykonywano w tak uzyskanym supernatancie. Stężenie glutationu zredukowanego oznaczano przy użyciu gotowych zestawów firmy Bioxytech, USA. Metoda oparta jest na reakcjach chemicznych zachodzących w dwóch etapach. W pierwszym etapie powstają tioetery pomiędzy reagentem i merkaptanami obecnymi w próbce. W drugim etapie dochodzi do eliminacji w środowisku zasadowym tioeterów uzyskanych z GSH do chromoforowych tionów, które wykazują maksimum absorbancji przy długości fali 400 nm. Stężenie glutationu zredukowanego wyrażano w mmol/g tkanki.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu *t-Studenta*. Za wartości istotne statystycznie przyjęto różniące się przy $p < 0,05$.

WYNIKI

Aktywność γ -glutamylotransferazy po podaniu chlorfenwinfosu w dawce wynoszącej 0,1 LD₅₀ wzrosła w 48 godzinie sześciokrotnie ($p < 0,001$) w stosunku do kontroli, natomiast w 1 i 24 godzinie nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy w porównaniu z grupą kontrolną.

W grupie szczurów otrzymujących chlorfenwinfos w dawce wynoszącej 0,5 LD₅₀, aktywność GGT wzrastała około 2-krotnie ($p < 0,02$) w 1 godzinie, ponad 2-krotnie ($p < 0,005$) w 24 godzinie i około 5-krotnie ($p < 0,001$) w 48 godzinie od wprowadzenia związku do organizmu. Obserwowany w 48 godzinie, wzrost aktywności GGT, był

istotnie statystycznie wyższy ($p < 0,001$) w porównaniu do wartości obserwowanych we wcześniejszych okresach badanych po podaniu chlorfenwinfosu w tej dawce (Tab. I).

Tabela I. Aktywność GGT (nmol/mg białka) w ostrym zatruciu chlorfenwinfosem
Activity of the liver GGT (nmol/mg protein) in the acute intoxication with chlorfenvinphos

kontrola	chlorfenwinfos					
	0,1 LD ₅₀			0,5 LD ₅₀		
	1 h	24 h	48 h	1 h	24 h	48 h
4,00±0,81 n=5	4,11±0,71 n=6	2,76±1,58 n=5	24,16±8,12 ^{abc} n=7 p<0,001	7,42±2,23 ^a n=6 p<0,01	9,09±1,87 ^a n=8 p<0,005	19,15±6,01 ^{abc} n=7 p<0,001

Wartości średnie ± SD; n – liczebność grupy; a – znamienne do kontroli; b, c – znamienne do wartości obserwowanych w 1 i 24 godz. odpowiednio

Stężenie glutationu zredukowanego po podaniu chlorfenwinfosu w dawce wynoszącej 0,1 LD₅₀ wzrosło ponad 3-krotnie ($p < 0,00001$) w porównaniu z grupą kontrolną w całym badanym okresie zatrucia. Natomiast po podaniu insektycydu w dawce wynoszącej 0,5 LD₅₀, wzrost stężenia GSH, w stosunku do kontroli wystąpił jedynie w 24 godz. po podaniu. Stężenie GSH wynosiło około 140% wartości ($p < 0,0001$) obserwowanej w grupie kontrolnej (Tab. II).

Tabela II. Stężenie GSH (mmol/g tkanki) w wątrobie w zatruciu ostrym chlorfenwinfosem
Concentration of the liver GSH (mmol/g tissue) in the acute intoxication with chlorfenvinphos

kontrola	chlorfenwinfos					
	0,1 LD ₅₀			0,5 LD ₅₀		
	1 h	24 h	48 h	1 h	24 h	48 h
23,56±1,64 n=7	70,15±5,08 ^a n=7 p<0,00001	77,77±4,79 ^a n=7 p<0,00001	72,18±2,57 ^a n=7 p<0,00001	25,42±2,53 ^b n=7 p<0,0001	34,35±1,32 ^{ab} n=7 p<0,0001	25,08±1,15 ^b n=7 p<0,001

Wartości średnie ± SD; n – liczebność grupy; a – znamienne do kontroli; b – znamienne do wartości obserwowanych po podaniu chlorfenwinfosu w dawce 0,1 LD₅₀

DYSKUSJA

Wzrost aktywności GGT obserwowano po podaniu różnego rodzaju ksenobiotyków. W badaniach na zwierzętach stwierdzano wzrost aktywności tego enzymu w surowicy krwi, homogenacie wątroby i mózgu po podaniu fenobarbitalu oraz w zatruciach przelekłych alkoholem i lekami przeciwpadaczkowymi [5, 6, 24].

Zaleska-Freljan i wsp. [24] stwierdziła w badaniach na myszach wzrost aktywności GGT w surowicy po podaniu bromfenwinfosu pojedynczo lub w mieszaninie z metoksylorem. Wzrost aktywności GGT w surowicy stwierdzono też u pracowników fabryki produkującej pestycydy fosforoorganiczne [19].

Z własnych wcześniejszych badań wynika, że w ostrym zatruciu chlorfenwinfosem dochodzi do zmiany aktywności wielu enzymów wątrobowych zarówno w samej wątrobie szczurów, jak i wzrostu ich aktywności w surowicy krwi. Dotyczy to enzymów wskaźnikowych takich jak: aminotransferaza asparaginianowa i alaninowa, a także hydrolaz kwaśnych [12, 13]. Szczególnie wysoki był wzrost aktywności β -glukuronidazy i fosfatazy kwaśnej w surowicy, co świadczy o daleko posuniętej dezintegracji komórki wątrobowej. Wzrost aktywności w surowicy enzymów świadczących o uszkodzeniu komórki wątrobowej potwierdzają też inni autorzy [4, 19]. Wyniki naszych wcześniejszych prac wykazały, że w zatruciu ostrym chlorfenwinfosem dochodzi do wzrostu stosunku mleczań/pirogoniany, zaniku glikogenu w wątrobie, wzrostu stężenia mleczań oraz zmian aktywności enzymów przeciwutleniających i stężenia dialdehydu malonowego [14, 15, 16].

Gamma-glutamylotranferaza jest enzymem, o czym już wspomniano we wstępie, biorącym udział w metabolizmie glutationu – jednego z głównych nieenzymatycznych przeciwutleniaczy [18].

Glutation zredukowany jest tripeptydem zawierającym cysteinę. Jego obecność w komórce jest niezbędna do utrzymania jej stanu oksydoredukcyjnego i przeciwdziałania efektom stresu oksydacyjnego. GSH syntetyzowany jest w komórkach różnego typu na drodze biochemicznej składającej się z wielu enzymów i co jest bardzo istotne może być bardzo szybko transportowany pomiędzy różnymi tkankami [9, 18]. Pierwszym etapem syntezy GSH jest przemiana kwasu glutaminowego i cysteiny w γ -glutamylcysteinę. Proces ten katalizowany jest przez syntetazę γ -glutamylcysteiny. Istnieje sprzężenie zwrotne pomiędzy tym etapem syntezy glutationu a jego stężeniem. Drugim etapem syntezy glutationu jest przekształcenie γ -glutamylcysteiny w GSH [17, 18, 21]. Glutation syntetyzowany jest we wszystkich komórkach, jednak najważniejszym miejscem jego syntezy jest wątroba, skąd uwalniany jest do krwi i do żółci [17, 20]. Obniżenie stężenia GSH w komórce prowadzi do szybkiego wzrostu stężenia nadtlenków lipidów [21].

W niniejszej pracy stwierdzono wzrost aktywności GGT w wątrobach szczurów otrzymujących chlorfenwinfos w obu badanych dawkach, przy czym najwyższą wartość tego enzymu obserwowano w 48 godzinie po intoksykacji. Wyniki badań histopatologicznych potwierdzają uszkodzenie komórek wątroby w zatruciu tym insektycydem, a nasilenie tych zmian rośnie w czasie [15]. W zatruciu chlorfenwinfosem obserwowano też wzrost stężenia GSH w wątrobie, przy czym najwyższy wzrost obserwowano po podaniu tego związku w niższej dawce. Glutation syntetyzowany jest w wątrobie, o czym już wspomniano. Uwalnianie glutationu dominuje nad jego pobraniem przez hepatocyty, ze względu na niską aktywność GGT na powierzchni hepatocyta [9, 10, 18]. Wysoka aktywność tego enzymu na powierzchni komórek trzustki i nerek powoduje, że komórki tych narządów sprawnie wychwytyją glutation z krwi [10, 18]. Wzrost stężenia GSH w wątrobie w zatruciu chlorfenwinfosem można więc, przynajmniej częściowo, tłumaczyć wzrostem aktywności γ -glutamylotransferazy w tym narządzie.

GSH jest zużywany przez peroksydazy, jak też pełni funkcję ochronną w stosunku do białkowych grup sulfhydrylowych [21]. Glutation zredukowany może być bezpośrednio wykorzystywany do zmiatania wolnych rodników: nadtlenku wodoru, rodnika hydroksylowego, anionorodnika ponadtlenkowego. W wyniku tej reakcji, która jest katalizowana przez peroksydazę glutationową, GSH jest utleniany do GSSG [9]. Z badań

innych autorów wynika, że ekspozycja organizmu na różne czynniki powodujące stres oksydacyjny prowadzi do wzrostu stężenia glutationu zredukowanego w organizmie [1, 9, 22]. Do wzrostu tego dochodzi w wyniku zwiększenia jego syntezy, poprzez indukcję syntetazy γ -glutamylcysteiny, a mechanizm ten uważany jest za wyraz zmian adaptacyjnych [22]. W niniejszej pracy jednakże nie oznaczano aktywności tego enzymu.

Na stężenie GSH w wątrobie mają wpływ różne czynniki, między innymi niedotlenienie [9] i N-nitrozodimetyloamina [22]. Zmiany stężenia glutationu zredukowanego podczas stresu oksydacyjnego mogą wynikać z modyfikacji jego syntezy i/lub strat glutationu [17, 18]. Zmiany w metabolizmie GSH w wątrobie, mogą być przyczyną zmian jego stężenia w ostrym zatruciu chlorfenwinfosem.

WNIOSEK

W ostrym zatruciu chlorfenwinfosem wzrost aktywności GGT w wątrobie wynika prawdopodobnie z zaburzenia funkcji komórek hepatocytów. Może to być jedną z przyczyn zmian stężenia glutationu zredukowanego w tym narządzie.

A. Łukaszewicz-Hussain, J. Moniuszko-Jakoniuk B.

ESTIMATION OF LIVER *GAMMA*-GLUTAMYLTRANSFERASE ACTIVITY AND REDUCED GLUTATHIONE CONCENTRATION IN RATS IN ACUTE POISONING WITH CHLORFENVINPHOS

Summary

The aim of this paper was estimation the GGT activity and GSH concentration in the liver of rats intoxicated with chlorfenvinphos.

The experiment was conducted on male Wistar rats divided into three groups: control-which received oil and examined – receiving oil solution of chlorfenvinphos in dose of 0.5LD₅₀ and 0.1 LD₅₀. At the 1st, 24th and 48th hour after intoxication an activity of enzyme was determined.

The GGT activity increased after 48th hour of intoxication with the lower dose of insecticide and after 1st, 24th and 48th with higher dose. The GSH concentration increased at the 1st, 24th and 48th hour of intoxication with chlorfenvinphos at dose 0.1 LD₅₀ and at the 24th hour of intoxication with chlorfenvinphos at dose 0.5 LD₅₀.

We suppose that increase in the liver GGT activity can result from disturbance in hepatic function. This increase can influence on the reduced glutathione level.

PIŚMIENNICTWO

1. Eaton D.L., Hamel D.M.: Increase in γ -glutamylcysteine synthetase activity as a mechanism for butylated hydroxyanisole-mediated elevation of hepatic glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994, 126, 145–149.
2. Gomes J., Dawodu A.H., Lloyd O., Revitt D.M., Anilas S.V.: Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides. *Hum. Exp. Toxicol.* 1999, 18, 33–37.
3. Hai Q.D., Varga Sz.I., Matcovics.: Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1997, 117C, 83–88.
4. Hernandez A.F., Gomez M.A., Pena G., Gil F., Rodrigo L., Pla A., Villanueva E.: Biochemical evidence for cholestatic hepatotoxicity after long-term exposure to pesticides in plastic greenhouse workers. *Toxicol. Lett.* 2001, 123 (Suppl. 1), 66.

5. *Hirayanagi N., Tshirogi T.*: Significance of serum gamma-glutamyl transpeptidase elevation caused by antiepileptic drugs using the antipirine metabolic capacity as a parameter of microsomal enzyme activity. *Nippon-Ika-Daigaku-Zasshi* 1991, 5, 547–560.
6. *Ishii H.*: Alcohol-induced enhancement of intestinal gamma-glutamyl transpeptidase activity in rats and humans. A possible role in increased serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in alcoholic. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1988, 12, 111–115.
7. *Kossmann S., Magner-Krezel Z.*: Biochemical indices of liver function in workers from repair brigades in chemical plants in Jaworzno. *Med. Pracy* 1992, 43, 505–508.
8. *Lodovici M., Casalini C., Briani C., Dolara P.*: Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixture. *Toxicology* 1997, 117, 55–60.
9. *LeGrand T.S., AW Yee T.*: Chronic hypoxia alters glucose utilization during GSH-dependent detoxication in rat small intestine. *Am. J. Physiol.* 1998, 274, G376–G384.
10. *Lenartowicz E., Wudarczyk J., Dębska G.*: Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych. *Post. Biochem.* 1996, 42, 154–161.
11. *Lowry D.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.*: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265–275.
12. *Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J., Galażyn-Sidorczuk M.*: Zmiany aktywności aminotransferaz w surowicy krwi i frakcjach homogenatu wątroby w zatruciu chlorfenwinfossem. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1996, 29, 279–282.
13. *Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J.*: Activity of lysosomal enzymes in acute intoxication with organophosphorus insecticides. *Pol. J. Environ. Stud.* 1997, 6, 51–54.
14. *Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J.*: Procesy glikolityczne w wątrobie szczura w zatruciu chlorfenwinfossem. *Med. Pracy* 1997, 5, 579–584.
15. *Łukaszewicz-Hussain A., Chyczewski L., Moniuszko-Jakoniuk J.*: Stężenie mleczanów i glukozy we krwi oraz glikogenu w wątrobie w zatruciu ostrym chlorfenwinfossem. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1998, 31, 251–258.
16. *Łukaszewicz-Hussain A.*: Organophosphate insecticide chlorfenwinphos affects superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde in rat liver. *Pol. J. Environ. Stud.* 2001, 10, 279–282.
17. *Malmezat T., Breuille D., Capitan P., Mirand P.P., Obled C.*: Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J. Nutr.* 2000, 130, 1239–1246.
18. *Parke D., Piotrowski J.*: Glutathione: its role in the detoxication on reactive oxygen and environmental chemicals. *Acta Pol. Toxicol.* 1996, 4, 1–14.
19. *Ranjbar A., Pasalar P., Abdollahi M., Khaghani S.H.*: The study of organophosphorus insecticides in oxidative stress and its relation to acetylcholine esterase (AChE) activity in pesticide factory workers. *Toxicol. Lett.* 2001, 123 (Suppl. 1), 69.
20. *Sansinea A.S., Cerone S.I., Streinteberger S.A., Garcia C., Auza N.*: Superoxide dismutase activity and reduced glutathione levels in Cu-overload liver from sheep. *Nutr. Res.* 1997, 17, 115–123.
21. *Spolarics Z., Wu J.X.*: Role of glutathione and catalase in H₂O₂ detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells. *Gastrointest. Liver Physiol.* 1997, 273, G1304–G1311.
22. *Taniguchi M., Yasutake A., Takedomi K., Inoue K.*: Effects of N-nitrosodimethylamine (NDMA) on the oxidative status of rat liver. *Arch. Toxicol.* 1999, 73, 141–146.
23. *Własiuk M.*: Gamma-glutamyltransferaza i jej przydatność w diagnostyce chorób wątroby. *Diagn. Lab.* 1982, 18, 237–244.
24. *Zalewska-Frejlan K., Wolewicz J.T.*: Influence of bromfenwinphos alone, and in the mixture with methoxychlor on levels of gamma-glutamyltransferase, ceruloplasmin and cholesterol in the blood plasma laboratory mice. *Pol. J. Pharmacol.* 1993, 45, 309–316.

Otrzymano: 2001.10.17