

Maria Kudlarczyk<sup>•</sup>

## Wpływ jednorazowych i chronicznych dawek czteroeptylku ołowiu na zawartość adenozyno-5-trójfosforanu (ATP) i glutationu (GSH) w krwi obwodowej myszy

### Streszczenie

Myszom podawano domięśniowo czteroeptylek ołowiu w dawkach jednorazowych (20 mg/kg masy ciała) i chronicznych (4 mg/kg masy ciała), a następnie w krwi obwodowej oznaczano poziom adenozyno-5'-trójfosforanu (ATP) i glutationu (GSH). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono w obu układach doświadczalnych u myszy obu płci duży spadek poziomu badanych związków w stosunku do zwierząt grup kontrolnych. W przypadku dawek jednorazowych najniższy poziom uzyskano w 12 godzinie od chwili iniekcji a w dawkach chronicznych po 14 dniach nastrzykiwania.

### WSTĘP

Dojrzały erytrocyt jest komórką pozbawioną jądra oraz wielu organeli komórkowych. Dlatego jego aktywność metaboliczna jest niewielka z wyjątkiem glikolizy beztlenowej (tor Parnas-Embden-Meyerhofa) i cyklu pentozowego. Z glikolizy beztlenowej erytrocyt czerpie energię w postaci adenozyno-5'-trójfosforanu (ATP) (Bogusławska-Jaworska, 1972; Jabłońska-Skwiecińska i in., 1977; Józwiak, 1985). Energia ta jest niezbędna dla zachowania przez krwinki prawidłowego i optymalnego kształtu oraz prawidłowej giętkości i elastyczności w celu sprawnego ich funkcjonowania. Ponadto energia jest potrzebna do utrzymania żelaza hemoglobiny w postaci dwuwartościowej. Energia zużywana jest również dla zabezpie-

<sup>•</sup> Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie, ul. Podbrzezie 3

czenia przed nieodwracalnym utlenieniem grup SH hemoglobiny, białek strukturalnych i enzymatycznych, gdyż proces ten doprowadza do ich denaturacji i utraty aktywności biologicznej. Energochłonnym procesem jest również redukcowanie grup SH glutationu (GSH) (Bogusławska-Jaworska, 1972; Feo i Mohandas, 1977; Trznadel i in., 1980). W cyklu pentozowym powstaje NADPH. Działa on jako koenzym w redukcji utlenionego glutationu i methemoglobiny (Jóźwiak, 1985). Zredukowany glutation (GSH) jest głównym czynnikiem układu oksydacyjno-redukcyjnego erytrocytów, bierze udział w rozkładzie nadtlenu wodoru oraz chroni przed utlenieniem grupy sulfhydrylowe hemoglobiny i innych białek, zwłaszcza enzymatycznych i błony erytrocytu (Abraham i in., 1978; Ishida i in., 1979; Jóźwiak, 1985; Orłowski i Karnowski, 1976).

Celem mojej pracy było zbadanie wpływu ołowiu (czteroetylek ołowiu) na poziom ATP i GSH w krwi myszy.

## MATERIAŁ I METODY BADAN

Badania przeprowadzono na myszach obu płci eksponowanych na czteroetylek ołowiu w dwóch układach doświadczalnych (dawki jednorazowe i dawki chroniczne). Do doświadczeń wybierano myszy o masie 25 g. Myszy otrzymywały domięśniowo 20 mg na 1 kg masy ciała (0,5 mg na 1 mysz) w dawkach jednorazowych czteroetylku ołowiu i po upływie 6, 12, 24 i 48 godzin od chwili iniekcji pobierano im krew na heparynę w celu oznaczenia poziomu ATP i GSH w krwi. W przypadku dawek chronicznych myszy otrzymywały domięśniowo czteroetylek ołowiu przez 7, 14 i 21 dni w dawkach dziennych po 4 mg na 1 kg masy ciała (0,1 mg na 1 mysz). Po upływie tego czasu pobrano myszom krew również na heparynę. Poziom ATP oznaczano w krwi metodą enzymatyczną za pomocą zestawu firmy Boeringer Mannheim GmbH Diagnostica, natomiast poziom glutationu określano w krwi metodą Ellmana (Ellman, 1959). Statystyczną ocenę uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą testu Studenta.

## WYNIKI

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono znaczne obniżenie poziomu ATP w krwi obwodowej myszy obu płci w obu układach doświadczalnych pod wpływem czteroetylku ołowiu w stosunku do grup kontrolnych (samice - 431,013  $\mu\text{M}/\text{l}$ , samce - 482,229  $\mu\text{M}/\text{l}$ ). W przypadku dawek jednorazowych najniższy poziom ATP otrzymano w 12 godzinie od chwili iniekcji i wynosił on u samic 186,905  $\mu\text{M}/\text{l}$ , a 100,437  $\mu\text{M}/\text{l}$  u samców. Przy podawaniu dawek chronicznych najniższy poziom ATP stwierdzono po 14 dniach iniekcji (samice - 96,446  $\mu\text{M}/\text{l}$ , samce - 87,134  $\mu\text{M}/\text{l}$ ) (tab. 1). Analizując zaś poziom GSH stwierdzono istotny jego spadek w krwi myszy po podaniu czteroetylku ołowiu w porównaniu z grupą kontrolną (samice - 1,167  $\text{mM}/\text{l}$ , samce - 1,347  $\text{mM}/\text{l}$ ). Zaobserwowano również analogię w stosunku do poziomu ATP. I tak w przypadku dawek jednorazowych najniższy poziom uzyskano w 12 godzinie od chwili iniekcji (samice - 0,249  $\text{mM}/\text{l}$ , samce 0,207  $\text{mM}/\text{l}$ ), a w przypadku dawek chronicznych najniższy poziom otrzymano po 14 dniach (samice - 0,548  $\text{mM}/\text{l}$ , samce - 0,481  $\text{mM}/\text{l}$ ) (tab. 2). Ta analogia w poziomie ATP i GSH może sugerować istnienie pewnej korelacji pomiędzy poziomem tych dwóch związków w krwinkach. Znacznemu obniżeniu uległ również hematokryt, co jest równoznaczne z istotnym zmniejszeniem się liczby erytrocytów pod wpływem czteroetylku ołowiu.

## OMÓWIENIE

Ołów może tworzyć wiele połączeń organicznych, z których największe znaczenie toksykologiczne mają: czteroetylek ołowiu, czterometylek ołowiu oraz stearynian ołowiu.

Czteroetylek ołowiu ma duże powinowactwo do lipidów i łatwo odkłada się w tkance nerwowej oraz w nerce i wątrobie (Madej i Żechałko, 1979; Trznadel i in., 1980). Działa on na

Tabela 1

Poziom adenozyno-5'-trójfosforanu (ATP) w krwi pełnej myszy eksponowanych na czteroetylek ołowiu

		Zawartość ATP w krwi pełnej w $\mu\text{M/l}$
kontrola		$431,013 \pm 59,374$
Dawki jednorazowe 20 mg/kg	po 6 godz.	$303,305^+ \pm 7,327$
	po 12 godz.	$186,905^+ \pm 4,977$
	po 24 godz.	$231,470^+ \pm 5,837$
	po 48 godz.	$341,883^+ \pm 8,857$
Dawki chroniczne 4 mg/kg	po 7 dniach	$342,549^0 \pm 5,279$
	po 14 dniach	$96,446^+ \pm 5,181$
	po 21 dniach	$190,231^+ \pm 4,189$
		$482,229 \pm 72,023$
		$235,461^+ \pm 9,256$
		$100,437^+ \pm 5,924$
		$141,010^+ \pm 5,837$
		$233,465^+ \pm 6,263$
		$300,644^+ \pm 5,924$
		$87,134^+ \pm 3,520$
		$141,677^+ \pm 4,544$

Liczba osobników w każdej grupie badanej wynosiła 7

+  $p \leq 0,001$

o  $p \leq 0,01$

Tabela 2

Poziom glutationu w krwi pełnej myszy eksponowanych na czteroetylek ołowiu

		Zawartość GSH w krwi pełnej w mM/l
kontrola		1,167 ± 0,035
dawki jednorazowe 20 mg/kg	po 6 godz.	0,836 <sup>+</sup> ± 0,028
	po 12 godz.	0,249 <sup>+</sup> ± 0,023
	po 24 godz.	0,711 <sup>+</sup> ± 0,014
	po 48 godz.	0,655 <sup>+</sup> ± 0,016
dawki chroniczne 4 mg/kg	po 7 dniach	0,809 <sup>+</sup> ± 0,023
	po 14 dniach	0,548 <sup>+</sup> ± 0,014
	po 21 dniach	0,623 <sup>+</sup> ± 0,014
		1,347 ± 0,051
		0,783 <sup>+</sup> ± 0,028
		0,207 <sup>+</sup> ± 0,016
		0,275 <sup>+</sup> ± 0,016
		0,731 <sup>+</sup> ± 0,022
		0,760 <sup>+</sup> ± 0,016
		0,481 <sup>+</sup> ± 0,014
		0,589 <sup>+</sup> ± 0,014

Liczba osobników w każdej grupie badanej wynosiła 7

+ p ≤ 0,001

ośrodkowy układ nerwowy oraz na wiele enzymów, powodując ich inaktywację oraz zaburzenie procesów oddychania tkankowego (Żechałko i Madej, 1979). Działanie toksyczne wywiera cała cząsteczka czteroetylku ołowiu oraz produkty rozkładu: trójetylek ołowiu, jony ołowiane i grupy etylowe. Ołów, jak i jony ołowiane wprowadzone do ustroju reagują z białkami otoczek krwinek, skracając ich czas przeżycia, oraz blokują enzymy zawierające grupy SH i powodują zaburzenia syntezy hemu, co w konsekwencji prowadzi do tzw. niedokrwistości syderoblastycznej nabytej (niedokrwistość toksohemolityczna - ołowicza) (Hrycek, 1981; Kittel, 1983; Skorkowska-Zieleniewska i in., 1983; Żechałko, 1979). Wynikiem niedokrwistości hemolitycznej oraz zmniejszania się ilości erytrocytów może być znaczne obniżenie poziomu glutationu i ATP w krwi pełnej myszy eksponowanych na czteroetylek ołowiu.

Blokowanie grup SH enzymów przez czteroetylek ołowiu i produkty jego rozkładu jest powodem znacznych zmian w układzie enzymatycznym erytrocytów, co prowadzi do zaburzeń katabolizmu glukozy i związanych z nim różnych przemian metabolicznych nukleotydów nikotynamidoadeninowych (NAD, NADP), ADP i ATP, redukcji glutationu i grup tiolowych różnych białek, redukcji methemoglobiny i in. (Hłyńczak i Sysa, 1968; Konopka, 1968; Lutz i in., 1981; Skorkowska-Zieleniewska i in., 1983). Wynikiem tych zaburzeń jest zapewne obniżenie poziomu ATP w krwi pełnej oraz glutationu, który często występuje jako koenzym. W reakcjach katalizowanych przez peroksydazę glutationową (Bogusławska-Jaworska, 1972; Gromadzińska i Zachara, 1980; Zachara i in., 1983).

Obniżenie poziomu ATP i GSH można by jeszcze tłumaczyć wpływem czteroetylku ołowiu na układ nerwowy. Związek ten odkładając się w mózgu pobudza ośrodkowy układ nerwowy, wywołuje m.in. konwulsje, torsje, brak łaknienia, co pośrednio może mieć wpływ na poziom badanych związków (głodzenie i inne stresy) (Kittel, 1983; Skorkowska-Zieleniewska i in., 1983; Żechałko i Madej, 1979).

## LITERATURA

1. Abraham E.C., Taylor J.F., Land C.A., 1978, Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism. *Biochem. J.* 174, 819-825.
2. Bogusławska-Jaworska J., 1972, Metabolizm krwinek czerwonych. I. Układy oksydoredukcyjne krwinek czerwonych i ich anomalie. *Przegl. Lek.* 29, 313-320.
3. Ellman G.L., 1959, Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77.
4. Feo C., Mohandas N., 1977, Clarification of role ATP in red-cell morphology and function. *Nature*, 256, 166.
5. Gromadzińska J., Zachara B., 1980, Wpływ ditiotretialu i glutationu na stabilność peroksydazy glutationowej łożyska ludzkiego. *Biul. WAM*, 23, 110-115.
6. Hłyńczak A.J., Sysa J., 1968, Methemoglobina i jej redukcja w krwinkach czerwonych, *Post. Biochem.* 14, 65.
7. Hrycek A., 1981, Badania cytochemiczne granulocytów krwi obwodowej u pracowników narażonych zawodowo na związki ołowiu. *Acta Hemat. Pol.*, 12, 23-27.
8. Ishida Y., Nakashima K., Fujii H., 1979, A combined system for the study of glutathione metabolism in erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 93, 381-389.
9. Jabłońska-Skwiecińska E., Rokicka-Milewska R., Kłopotcka J., Zelenay E. (wsp. techn. Majewska Z.), 1977, Poziom adenozynotrójfosforanu oraz stężenie sodu i potasu w krwinkach czerwonych u dzieci zdrowych. *Diagn. Lab.*, 13, 205-208.
10. Józwiak Z., 1985, Udział nukleotydów adeninowych w regulacji struktury i właściwości erytrocytów. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 39, 116.
11. Kittel M., 1983, Toksydynamika przewlekłych zatruc małymi dawkami ołowiu. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 37, 325-344.
12. Konopka K., 1968, Defekty enzymatyczne krwinek czerwonych. *Post. Biochem.*, 14, 49.

13. Lutz W., Jażdżewski B., Grande G., 1981, Stężenie nukleotydów adeninowych w krwinkach czerwonych u pracowników Mazowieckich Zakładów Rafineryjnych i Petrochemicznych w Płocku. Biul. WAM, 24, 261-266.
14. Madej J.A., Żechałko A., 1979, Wpływ niedoborów żywieniowych na toksyczność ołowiu i kadmu u szczurów doświadczalnych. Cz. 5. Badania histopatologiczne wątroby i nerek. Bromat. Chem. Toksykol., 12, 363-369.
15. Orłowski M., Karnowsky A., 1976, Glutathione metabolism and some possible functions of glutathione in the nervous system. Acad. Press. Inc. New York.
16. Skorowska-Zieleniewska J., Szymonowicz H., Marszał P., 1983, Biochemiczna ocena poziomu ołowiu we włosach populacji mieszanej. Cz. 1. Badania wstępne. Roczn. PZH, 34, 175-179.
17. Trznadel K., Rutkowski K., Luciak M., 1980, Badania nad zachowaniem się związków wysokoenergetycznych u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. Biul. WAM, 23, 246-252.
18. Zachara B., Wąsowicz W., Gromadzińska J., Skłodowska M., 1983, Stężenie selenu i aktywność peroksydazy glutationowej we krwi mieszkańców Łodzi i okolic. Badania wstępne. Roczn. PZH, 34, 359-368.
19. Żechałko A., 1979, Wpływ niedoborów żywieniowych na toksyczność ołowiu i kadmu u szczurów doświadczalnych. Cz. 2. Badania hematologiczne. Bromat. Chem. Toksykol., 12, 153-159.
20. Żechałko A., Madej J.A., 1979, Wpływ niedoborów żywieniowych na toksyczność ołowiu i kadmu u szczurów doświadczalnych. Cz. 6. Badania histopatologiczne oraz zawartość ołowiu w mózgowiu. Bromat. Chem. Toksykol., 12, 371-376.



**Maria Kudlarczyk**

**THE INFLUENCE OF SINGLE AND CHRONIC DOSES OF LEAD TETRAETHYLIDE ON THE CONTENT OF ADENOSINO-5-TRIPHOSPHATE (ATP) AND OF GLUTATHIONE (GSH) IN PERIPHERAL BLOOD OF THE MOUSE**

Summary

The mice were administered lead tetraethylide intramuscularly in single (20 mg/kg of body mass) and chronic doses (4 mg/kg of body mass) and then the content of adenosino-5-triphosphate (ATP) and glutathione (GSH) was determined in peripheral blood. As a result of the research a large decrease of the content of the compounds under study in relation to the control groups was proved in both experimental systems in both sexes of the mouse. In the case of single doses the smallest content was obtained in 12 hours after the injection and as far as the chronic doses are concerned, after 14 days of injecting.

**Мария Кудлярчик**

**ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНЫХ И ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ДОЗ ТЕТРАЭТИЛСВИНЦА НА СОДЕРЖАНИЕ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТА /АТФ/ И ЗН-ГЛЮТАТИОНА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ**

Резюме

Мыши получали внутримышечно тетраэтилсвинец в разовых дозах /20 мг на кг веса/, а затем в периферической крови был определен уровень аденозин-5'-трифосфата /АТФ/ и ЗН-глютамина. В следствие проведенных исследований было установлено в опытных группах мышей обоих полов огромное падение уровня исследованных соединений по отношению к контрольным группам. В случае однократных доз самый низкий уровень был получен через 12 часов после инъекции, а в повторяющихся дозах через 14 дней.