

*Krystyna Mnich<sup>\*</sup>, Dorota Wielgus<sup>\*</sup>*

## Ocena aktywności esterazy lizosomalnej w niektórych narządach i tkankach zwierząt obciążonych chlorkiem glinu

### Streszczenie

Oznaczano aktywność esterazy lizosomalnej (EL) w mózgu, wątrobie, nerkach, mięśni szkieletowym uda i mięśni sercowym myszy po ich obciążeniu chlorkiem glinu w dawce 50 mg/kg wagi ciała.

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że chlorek glinu po 7-dniowym podaniu powoduje istotny wzrost aktywności enzymu we wszystkich badanych narządach i tkankach. Natomiast u zwierząt, którym podawano chlorek glinu przez 14 dni zauważono obniżenie aktywności esterazy lizosomalnej w stosunku do zwierząt otrzymujących chlorek glinu przez 7 dni. Z kolei po 21-dniowym podaniu chlorku glinu stwierdzono ponowny wzrost aktywności enzymu.

W pracy dyskutowany jest problem zmian aktywności esterazy lizosomalnej po podaniu chlorku glinu.

### Wstęp

Glin jest metalem, którego biochemiczna i fizjologiczna rola nie jest jeszcze dobrze poznana. Toksyczny wpływ glinu po raz pierwszy był obserwowany przez Siema w 1886 r., a opisany przez Döllkena w 1897 r. Döllken opisał zmiany zwyrodnieniowe neuronów mózgu królików, którym wstrzykiwano winian glinu. Zmiany w centralnym układzie nerwowym po podaniu soli glinu były obserwowane również w 1929 r. przez Seiberta i Wellsa.

---

<sup>\*</sup> Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie

W 1942 r. Kopeloff opisał efekt padaczkowy wywołany przez wodorotlenek glinu pochodzący z pasty do zębów (Boegman, Bates 1984).

W 1972 r. Alfrey i współpracownicy opisali encefalopatię dializacyjną, zespół występujący u dializowanych chorych na przewlekłą niewydolność nerek i prowadzących po pewnym czasie do zgonu chorego, mimo prawidłowo przeprowadzonej hemodializy (Głuszek 1987). Odkrycie w 1976 dużego stężenia glinu w substancji szarej mózgu nasunęło podejrzenie, że zatrucie tym pierwiastkiem jest przyczyną omawianego powikłania (Alfrey 1980). Dalsze obserwacje potwierdziły wstępne przypuszczenia, że duża zawartość glinu w wodzie stosowanej do hemodializ jest przyczyną omawianego zespołu (Alfrey 1993).

W 1978 doniesiono o częstym współistnieniu encefalopatii dializacyjnej i osteomalacji (nadmierna miękkość kości i skłonność do złamań). Zwrócono także uwagę na związek encefalopatii z niedokrwistością mikrocytową (Głuszek 1987).

Jednocześnie liczne badania potwierdziły wysokie stężenie aluminium w mózgu zmarłych na chorobę Alzheimera, zwłaszcza w charakterystycznych dla tego schorzenia płytkach. U zwierząt doświadczalnych, którym podawano roztwory soli glinu zaobserwowano powstawanie splątków nerwowych podobnych do tych, które obserwuje się w mózgach zmarłych. Niektóre prace kwestionują rolę glinu w chorobie Alzheimera (Kulczycki 1993). Nie zmienia to jednak faktu, że aluminium wywołuje w centralnym układzie nerwowym dramatyczne zmiany (Erasmus 1993). Nadmierne podanie glinu prowadzi do jego akumulacji w mózgowiu, szczególnie w istocie szarej (Boegman, Bates 1984). Metal ten indukuje degenerację neuronów w różnych komórkach, np. w komórkach macek owadów, komórkach rdzenia kręgowego, komórkach piramidowych kory mózgowej i wielu innych. Jednocześnie ze wzrostem zwłóknień, obserwuje się ponad 20-krotne obniżenie liczby mikrokanalików w uszkodzonych neuronach, jak również w dendrytach i komórkach pamięci. Poza tym aluminium zmienia kształt dendrytów i gęstość synaps, indukuje zmiany chorobowe w neuronalnych strukturach podporowych komórek, zaburza transport aksonalny. Inhibującą rolę jonów tego pierwiastka wykazano w stosunku do ważnych neurotransmiterów: choliny, acetylocholinoesterazy, acetylotransferazy cholinowej, noradrenaliny, serotoniny, kwasu glutaminowego i kwasu gammaaminomasłowego (Graczyk, Długaszek 1993).

Udowodniono, że glin zaburza proces włączenia inozytolu do cząsteczek fosfolipidów. Ponadto, indukowana przez karbachol hydroliza fosfolipidów

jest również hamowana przez jony tego metalu. Znaczne zaburzenie systemu przewodzącego zależnego od fosfatydyloinozytolu prowadzi do upośledzenia czynności komórki nerwowej, a nawet do jej śmierci (Birchall, Chappel 1988; Najda, Gmiński 1992). Potwierdzono również hamujący wpływ aluminium na proces glikolizy w mózgu (Lai, Blass 1984, Johnson Jope 1986).

Zatrucie glinem może prowadzić do anemii, wyższe stężenie glinu blokuje bowiem aktywność dehydrogenazy kwasu aminolewulinowego, który bierze udział w pierwszych etapach syntezy hemu (Zaman, Batcabe 1994).

Jony  $Al^{3+}$  wykazują również efekt inhibitujący w stosunku do leukocytów, głównie limfocytów (Graczyk, Długaszek 1993).

Metabolizm komórek może być naruszony na wielu drogach, wynika to z własności tego pierwiastka, który może łączyć się z aminokwasami, peptydami, białkami, kofaktorami i węglowodanami (Srebro, Lach 1994, Zaman, Batcabe 1994). Większość enzymów aktywowanych przez jony magnezu i wapnia jest inhibitowana przez jony glinu. Wytworzenie silnego kompleksu  $Al^{3+}$  – ATP powoduje, że glin staje się również inhibitorem licznych enzymów, dla których ATP jest substratem (Graczyk, Długaszek 1993). Aluminium tworzy również silne kompleksy z lipidami, których skala trwałości bywa znacznie większa niż odpowiedni kompleks z jonami magnezu lub wapnia (Ficek 1994).

Strukturami wewnątrzkomórkowymi narażonymi na działanie glinu są chromatyna i DNA. W chromatynie i DNA istnieje wiele miejsc, w których ten pierwiastek ulega podstawieniu (Boni, Segar, Crapper-McLachlan 1980, Karlik 1980).

Doniesienia z ostatnich lat wskazują na jeszcze jeden prawdopodobny mechanizm toksyczności glinu, który związany być może z generowanymi przez jon tego metalu wysoce reaktywnymi rodnikami. Według tej hipotezy zwiększona ilość glinu i żelaza może prowadzić do uszkodzenia komórek w przebiegu stresu oksydacyjnego (Erasmus 1993, Srebro, Lach 1994). Sugeruje się, że stres oksydacyjny, będący wynikiem formowania wysoce reaktywnych rodników hydroksylowych, przy współdziałaniu glinu i żelaza może być przyczyną choroby Alzheimer'a (Srebro, Lach 1994) i choroby Parkinsona (Olanow 1993).

W różne aspekty metabolizmu metali zaangażowane są lizosomy (Sternlieb, Goldfischer 1976). Są one strukturami, które posiadają zdolność oddzielania i chelatowania potencjalnie toksycznych metali (Humbert 1982). Nadmierna jednak koncentracja metali obecnych w lizosomach, czy wokół

nich podnosi pobieranie czy zmniejszanie wydzielania komórkowego, prowadzi do kolejnych zmian struktury lizosomów czy zawartych w nich enzymów (Sternlieb, Goldfischer 1976).

W świetle tych informacji interesującym wydaje się prześledzenie wpływu wielokrotnych dawek chloreku glinu na aktywność enzymów lizosomalnych. Stąd też celem tej pracy jest prześledzenie aktywności esterazy lizosomalnej w niektórych narządach myszy.

## Material i metody

Badania przeprowadzono na 24 samicach i 24 samcach myszy białej o średniej wadze 25 gramów. Zwierzęta te hodowano w warunkach oświetlenia LD 12 : 12 i żywiono pokarmem standardowym.

Myszy obu płci podzielono na 4 grupy: jedną grupę kontrolną i trzy grupy doświadczalne. Grupę kontrolną stanowiły osobniki nie poddawane działaniu  $AlCl_3$ . Zwierzęta grup doświadczalnych otrzymywały chlorek glinu w dawce 50 mg/kg wagi ciała: osobniki pierwszej grupy badawczej przez 7 dni, myszy z drugiej grupy przez 14 dni, a z trzeciej grupy doświadczalnej przez 21 dni. Iniekcje były wykonywane rano o 8<sup>30</sup>.

Myszy zabijano przez dekapitację po 24 godzinach od czasu ostatniej iniekcji. Do badań pobierano mózg, wątrobę, nerki, mięsień sercowy i mięsień szkieletowy uda. Pobrane narządy przemywano oziębionym roztworem 0,9% NaCl do zaniku krwi. Następnie narządy ważono i homogenizowano 3 razy po minucie stosując homogenizator teflonowy.

Do sporządzenia homogenatu użyto 0,1 M buforu fosforanowego o pH = 6,8 z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100, który rozrywa błony lizosomalne. Otrzymany homogenat pozostawiono na 24 godziny w temperaturze 4°C. Po 24 godzinach homogenat wirowano przez 20 minut przy 13 tysiącach obrotów na minutę. Uzyskany nadsącz używano do badań enzymatycznych. W celu obliczenia aktywności esterazy lizosomalnej oznaczono najpierw stężenie białka zmodyfikowaną metodą Lowry'ego. Aktywność esterazy lizosomalnej oznaczono metodą mikrospektrofotometryczną według Barreta (1972).

Z uzyskanych wyników obliczono średnie arytmetyczne, odchylenie standardowe i średni błąd. Dla stwierdzenia czy różnice między uzyskanymi wynikami w pierwszej i drugiej grupie doświadczalnej w stosunku do wartości kontrolnych są istotne, zastosowano test „t” Studenta-Gosseta. Za

istotną przyjęto taką różnicę, jeśli prawdopodobieństwo przypadkowego zaistnienia różnicy jest równe lub większe od 0,05. Otrzymane wyniki zestawiono w 10 tabelach.

## Wyniki

U samic grupy kontrolnej aktywność esterazy lizosomalnej wyniosła kolejno (wartości podano w  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/godzinę): 299 w mózgu, 424 w wątrobie, 368 w nerkach, 274 w mięśni sercowym i 175 w mięśni szkieletowym.

U samców: 315 w mózgu, 398 w wątrobie, 404 w nerkach, 293 w mięśni sercowym i 200 w mięśni szkieletowym.

Podawanie przez 7 dni myszom pierwszej grupy doświadczalnej chlorku glinu w dawce 50 mg/kg wagi ciała spowodowało wzrost aktywności esterazy lizosomalnej we wszystkich badanych narządach, w stosunku do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. Różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi w serii kontrolnej i iniekcyjnej były statystycznie nieistotne.

W mózgu samic nastąpił wzrost aktywności badanego enzymu o 38,8% do wartości 415  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 1) i o 39,4% do wartości 439  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h w mózgu samców (tab. 2).

W wątrobie samic aktywność esterazy lizosomalnej wzrosła o 51,8% uzyskując wartość 644  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 3) i o 54,5% do wartości 615  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samców (tab. 4).

W nerkach zanotowano wzrost aktywności enzymu o 57,1% do wartości 578  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samic (tab. 5), u samców był to wzrost o 50% do wartości 606  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 6).

W mięśni sercowym samic stwierdzono wzrost aktywności esterazy lizosomalnej o 14,2% uzyskując wynik 313  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 7), a u samców o 8,2% do wartości 317  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 8).

W mięśni szkieletowym samic aktywność enzymu wzrosła do 187  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h, czyli o 6,8% (tab. 9) i do 237  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h, czyli o 18,5% u samców (tab. 10).

14-dniowe podanie chlorku glinu wywołało niewielki, ale statystycznie istotny wzrost aktywności esterazy lizosomalnej w mózgu i mięśni szkieletowym samic, w pozostałych narządach zwierząt tej płci różnice pomiędzy wartościami grupy kontrolnej i tej grupy doświadczalnej były statystycznie nieistotne.

U samców zanotowano wzrost aktywności enzymu w mięśniu sercowym, zmiany w innych narządach były statystycznie nieistotne. W mózgu samic aktywność badanego enzymu wzrosła o 7% do wartości 320  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 1), u samców zanotowano spadek o 1% uzyskując 312  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 2). W wątrobie samic nastąpił wzrost aktywności esterazy lizosomalnej uzyskując wartość 434  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h, czyli o 2,4% (tab. 3) i o 5% do wartości 418  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samców (tab. 4).

W nerkach samic stwierdzono spadek aktywności enzymu o 1,1% do wartości 364  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 5), u samców był to spadek do wartości 394  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h, czyli o 2,5% (tab. 6).

W mięśniu sercowym samic zanotowano wzrost aktywności esterazy lizosomalnej o 1,1% do wartości 277  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 7) i o 4,8% uzyskując wartość 307  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samców (tab. 8).

W mięśniu szkieletowym nastąpił wzrost aktywności esterazy lizosomalnej o 5,1% do wartości 184  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samic (tab. 9) i spadek aktywności tego enzymu o 3% do wartości 194  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samców (tab. 10).

Podawanie chlorku glinu przez 21 dni zwierzętom trzeciej grupy doświadczalnej spowodowało ponowny wzrost aktywności esterazy lizosomalnej we wszystkich badanych narządach w porównaniu do grupy kontrolnej. Różnice pomiędzy uzyskanymi wynikami w grupie kontrolnej i w tej grupie badawczej były statystycznie istotne.

W mózgu samic nastąpił wzrost aktywności badanego enzymu o 31,1% uzyskując wartość 392  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 1), a u samców był to wzrost o 27,3% do wartości 401  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 2).

W wątrobie samic zanotowano wzrost aktywności esterazy lizosomalnej do wartości 516  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h, czyli o 32,3% (tab. 3) i o 28,6% do wartości 512  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samców (tab. 4).

W nerkach samic stwierdzono wzrost aktywności enzymu o 38,8% uzyskując wartość 511  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 5) i o 31,7% do wartości 532  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samców (tab. 6).

W mięśniu sercowym nastąpił wzrost aktywności esterazy lizosomalnej do wartości 350  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h, czyli o 27,7% (tab. 7) u samic, u samców był to wzrost do wartości 340  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h czyli o 16% (tab. 8).

W mięśniu szkieletowym wzrost ten wyniósł 27,4% uzyskując wartość 223  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h u samic (tab. 9), natomiast u samców o 28% do wartości 256  $\mu\text{M}/\text{mg}$  białka/h (tab. 10).

**Tab. 1.** Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w mózgu samic myszy po podaniu chlorku glinu (AlCl<sub>3</sub>)

Grupa badawcza	Dawka AlCl <sub>3</sub>	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w mg/μl	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w μM/mg białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	7,568	299	31,579	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	7,310	415	30,930	138,8	178,736*
II Grupa doświadczalna	50	14	7,511	320	29,897	107	12,480*
III Grupa doświadczalna	50	21	7,425	392	24,187	131,1	12,580*

**Tab. 2.** Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w mózgu samców myszy po podaniu chlorku glinu (AlCl<sub>3</sub>)

Grupa badawcza	Dawka AlCl <sub>3</sub>	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w mg/μl	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w μM/mg białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	7,615	315	20,570	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	7,310	439	15,735	139,4	25,646*
II Grupa doświadczalna	50	14	7,568	312	15,727	99	0,619
III Grupa doświadczalna	50	21	7,482	401	10,392	127,3	8,450*

\* – wynik statystycznie istotny

**Tab. 3. Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w wątrobie samic myszy po podaniu chlorku glinu (AlCl<sub>3</sub>)**

Grupa badawcza	Dawka AlCl <sub>3</sub>	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w mg/μl	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w μM/mg białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	11,61	424	30,191	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	11,25	644	31,718	151,8	144,073*
II Grupa doświadczalna	50	14	11,46	434	25,578	102,4	2,168
III Grupa doświadczalna	50	21	11,32	561	23,910	132,3	21,812*

**Tab. 4. Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w wątrobie samców myszy po podaniu chlorku glinu (AlCl<sub>3</sub>)**

Grupa badawcza	Dawka AlCl <sub>3</sub>	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w mg/μl	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w μM/mg białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	11,54	398	28,894	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	11,09	615	61,882	154,5	6,578*
II Grupa doświadczalna	50	14	11,54	418	18,470	105	1,918
III Grupa doświadczalna	50	21	11,32	512	18,245	128,6	10,649*

\* – wynik statystycznie istotny



**Tab. 5.** Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w nerkach samic myszy po podaniu chlorku glinu ( $\text{AlCl}_3$ )

Grupa badawcza	Dawka $\text{AlCl}_3$	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w $\text{mg}/\mu\text{l}$	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w $\mu\text{M}/\text{mg}$ białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	10,75	368	11,625	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	10,53	578	19,414	157,1	25,770*
II Grupa doświadczalna	50	14	10,75	364	23,145	98,9	0,337
III Grupa doświadczalna	50	21	10,67	511	45,186	138,8	4,216*

**Tab. 6.** Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w nerkach samców myszy po podaniu chlorku glinu ( $\text{AlCl}_3$ )

Grupa badawcza	Dawka $\text{AlCl}_3$	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w $\text{mg}/\mu\text{l}$	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w $\mu\text{M}/\text{mg}$ białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	11,16	404	28,271	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	10,75	606	35,646	150	5,624*
II Grupa doświadczalna	50	14	11,18	394	33,912	97,5	1,772
III Grupa doświadczalna	50	21	10,97	532	12,302	131,7	8,016*

\* – wynik statystycznie istotny

**Tab. 7.** Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w mięśni sercowym samic myszy po podaniu chlorku glinu ( $\text{AlCl}_3$ )

Grupa badawcza	Dawka $\text{AlCl}_3$	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w $\text{mg}/\mu\text{l}$	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w $\mu\text{M}/\text{mg}$ białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	7,482	274	22,586	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	7,195	313	29,307	114,2	5,803*
II Grupa doświadczalna	50	14	7,424	277	5,612	101,1	0,177
III Grupa doświadczalna	50	21	7,138	350	14,024	127,7	8,876*

**Tab. 8.** Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w mięśni sercowym samców myszy po podaniu chlorku glinu ( $\text{AlCl}_3$ )

Grupa badawcza	Dawka $\text{AlCl}_3$	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w $\text{mg}/\mu\text{l}$	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w $\mu\text{M}/\text{mg}$ białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	7,367	293	12,165	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	7,224	317	10,563	108,2	14,980*
II Grupa doświadczalna	50	14	7,367	307	6,733	104,8	2,577*
III Grupa doświadczalna	50	21	7,167	340	20,296	116	5,780*

\* – wynik statystycznie istotny

**Tab. 9.** Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w mięśni szkieletowym samic myszy po podaniu chlorku glinu ( $\text{AlCl}_3$ )

Grupa badawcza	Dawka $\text{AlCl}_3$	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w $\text{mg}/\mu\text{l}$	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w $\mu\text{M}/\text{mg}$ białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	5,174	175	18,680	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	5,074	187	17,916	106,8	15,707*
II Grupa doświadczalna	50	14	5,060	184	20,968	105,1	3,934*
III Grupa doświadczalna	50	21	5,016	223	16,882	127,4	26,696*

**Tab. 10.** Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w mięśni szkieletowym samców myszy po podaniu chlorku glinu ( $\text{AlCl}_3$ )

Grupa badawcza	Dawka $\text{AlCl}_3$	Ilość iniekcji	Średnie stężenie białka całkowitego w $\text{mg}/\mu\text{l}$	Średnia aktywność esterazy lizosomalnej w $\mu\text{M}/\text{mg}$ białka/h	Odchylenie standardowe Sd	Procent kontroli	Test „t”
Grupa kontrolna	–	–	5,461	200	34,340	100	–
I Grupa doświadczalna	50	7	5,002	237	47,497	118,5	2,812*
II Grupa doświadczalna	50	14	5,088	194	39,538	97	1,154
III Grupa doświadczalna	50	21	4,988	256	22,256	128	4,634*

\* – wynik statystycznie istotny

## Dyskusja

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że chlorek glinu podawany w dawce 50 mg/kg wagi ciała przez 7 dni (pierwsza grupa doświadczalna), 14 dni (druga grupa doświadczalna) i 21 dni (trzecia grupa doświadczalna) wywołuje zmiany aktywności esterazy lizosomalnej.

Kiedy jony glinu, pomimo zewnętrznych barier, wnikną do komórki, wewnętrzne mechanizmy tolerancji zaczynają pracę. Polegają one na modyfikacji i adaptacji komórkowego metabolizmu do warunków stresu (Śląski 1993). Jednym z przejawów wpływu jonów glinu na cytoplazmę komórki jest zwiększenie liczby lizosomów (Graczyk, Długaszek 1993). Wydaje się to mieć swoje uzasadnienie, ponieważ przedział lizosomalny jest swoistym zabezpieczeniem komórek przed stresogennymi czynnikami (Klasing 1985, Miyawaki 1988, Dunn 1990). Tworzy on swoisty układ kompensacyjny komórki poddanej niekorzystnym warunkom egzystencji. Komórkowe mechanizmy kompensacyjne na poziomie przestrzeni lizosomalnej to przede wszystkim procesy autofagocytozy, mogące przebiegać ze znacznym wzrostem proteolizy i lipolizy (Król 1994). Wydaje się, że tym należy tłumaczyć wzrost aktywności esterazy lizosomalnej we wszystkich badanych narządach u zwierząt w pierwszej grupie doświadczalnej.

Największy wzrost zanotowano w wątrobie, nerkach i mózgu.

Chociaż rola wątroby w metabolizmie glinu nie jest jednoznacznie wyjaśniona, to podanie dużych dawek związków tego metalu, powoduje jego kumulację w tym organizmie w dużych ilościach. Tkanka kostna, śledziona i wątroba są tymi narządami, w których glin gromadzi się w pierwszej kolejności (Graczyk, Długaszek 1993). Komórkami wątroby szczególnie narażonymi na jony tego metalu są hepatocyty, w mniejszym stopniu komórki Kupffera (Galle, Giudicelli 1982).

Narządem, w którym glin gromadzi się również w dużych ilościach są nerki (Głuszek 1987, Linss 1992). Poza tym przez komórki nerkowe są reabsorbowane i eliminowane głównie toksyny, m.in. sole aluminium. W procesie tym lizosomy odgrywają główną rolę (Berry i wsp. 1988).

Glin gromadzi się także w centralnym układzie nerwowym wywołując w nim największe zmiany (Erasmus i wsp. 1994). Wielu autorów wykazało nierównomierne rozmieszczenie glinu w różnych częściach mózgu. W istocie szarej jego stężenie jest ponad dwa razy większe, w porównaniu do istoty białej. Stężenie glinu jest znacznie wyższe w małych naczyniach i oponach mózgowo-rdzeniowych niż w tkance otaczającej tkankę mózgową

(Boegman, Bates 1984, Kulczycki 1993). Nie ma dowodów na to, aby glin powodował zmiany w przepuszczalności bariery krew – mózg, podobnie jak nie jest wyjaśniony ewentualny mechanizm neurotoksycznego działania glinu. Nieznana jest dynamika przenikania glinu do mózgu przez uszkodzoną barierę krew – mózg (Ludwicki 1993). Wiadomo jednak, że gdy komórka nerwowa poddana jest działaniu czynników stresotwórczych (np. toksyczne metale), to obserwuje się bardzo szybki wzrost wakuol autofagalnych, które w normalnych neuronach spotyka się rzadko (Kamiński 1989).

Spadek aktywności esterazy lizosomalnej u zwierząt w drugiej grupie doświadczalnej, w stosunku do myszy pierwszej grupy badawczej i niewielki, przeważnie statystycznie nieistotny, wzrost lub spadek aktywności enzymu, w porównaniu do osobników grupy kontrolnej może być przejawem adaptacji komórek do nowych warunków. Komórki posiadają bowiem wiele mechanizmów unieszkodliwienia jonów glinu. Jony  $Al^{3+}$  mogą być chelatowane przez cytoplazmatyczne ligandy, takie jak: kwasy organiczne (cytryniany, maloniany), polipeptydy (Śląski 1993). Jak ważna jest rola tych ligandów dowodzi Birchall i Chappel (1988). *In vitro*,  $Al^{3+}$  hamuje reakcję formowania glukozo-6-fosforanu poprzez wiązanie ATP silniej niż  $Mg^{2+}$  (aktywatora tej reakcji), tworzy się nieaktywny kompleks ATP-Al. Aktywność jest przywrócona w obecności cytrynianu, ponieważ wiąże glin silniej niż ATP. Cytrynian przeszkadza więc w formowaniu ATP-Al i umożliwia formowanie aktywnego kompleksu ATP-Mg.

Ważnym chelatorem, aczkolwiek niedocenionym, jest kwas krzemowy. Udowodniono, że odpowiednio duże stężenie tego pierwiastka zapobiega uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego przez jony glinu (Najda, Gmiński 1992). Sądzi się, że mechanizm tolerancji glinu związany być może także z indukcją metaloprotein (białek o wysokiej zawartości aminokwasów sulfhydrylowych, mających zdolność unieszkodliwiania toksycznych metali), jak wykazano to w przypadku kadmu (Crapper-McLachlan i wsp. 1980).

Tolerancja glinu może być osiągnięta przez oddzielenie tego jonu w przedziałach, które do pewnego stopnia są „odporne” na jego toksyczność. Strukturami zdolnymi do oddzielenia i chelatowania toksycznych metali są lizosomy (Sternlieb, Goldfischer 1976). Są one organellami stanowiącymi ochronę dla komórek przed toksycznym oddziaływaniem, m.in. aluminium (Humbert 1982). Glin w lizosomach, co potwierdziły badania przy użyciu sondy jonowej, występuje w ekwimolarnych połączeniach z fosforanami. Badania prowadzone na tkankach mózgu wykazały obecność aluminium

w wysokiej koncentracji w lizosomach, gdzie był obecny w postaci podobnych do igieł, mikrokrystalicznych form o średnicy 0,006 mikronów i długości 0,08 mikronów. Połączony był z fosforem, w stosunku jeden atom glinu na jeden atom fosforu (Galle i wsp. 1979). Podobne badania prowadzone na tkankach wątroby (Galle, Giudicelli 1982), nerek (Linss i wsp. 1991) i przytarczyc (Galle i wsp. 1987) potwierdziły obecność w lizosomach fosforanowych nierozpuszczalnych połączeń glinu.

Nadmierna jednak koncentracja metali może być przyczyną zmian struktury, przepuszczalności i integralności błony lizosomalnej i uwolnienia enzymów z tych organelli (Sternlieb, Golgfischer 1976). Dzieje się tak, ponieważ nieorganiczne związki glinu, np. glinokrzemiany, nie mogą być degradowane, będą one kumulować się w lizosomach i będą stopniowo prowadzić do dysfunkcji lizosomów.

Większość katabolicznych enzymów zawartych w lizosomach będzie uchodzić i prowadzić do degeneracji, np. komórek mózgu (Tokutake i wsp. 1995). Fakt, że glin może uszkadzać lizosomy, potwierdzają badania prowadzone na tkankach wątroby, nerek i śledziony (Laske i wsp. 1987, Stein i wsp. 1988).

To może być przyczyną ponownego wzrostu aktywności esterazy lizosomalnej u myszy w trzeciej grupie doświadczalnej, w porównaniu do wartości otrzymanych w grupie zwierząt kontrolnych i drugiej grupy badawczej.

Aktywność esterazy lizosomalnej w mózgu, wątrobie i nerkach była jednak mniejsza niż w pierwszej grupie doświadczalnej. Wyjaśnieniem tego może być selektywne hamowanie syntezy enzymów. Potwierdzone jest takie oddziaływanie jonów glinu na niektóre enzymy lizosomalne, np. na beta-glukuronidazę (Stein i wsp. 1987, Laske i wsp. 1989), kwaśną fosfatazę (Graczyk, Długaszek 1993). Wyniki naszych badań również wskazują na inhibitowanie esterazy lizosomalnej.

W jaki sposób jony glinu mogą wpływać na syntezę enzymów lizosomalnych?

Strukturami, obok lizosomów, w których glin gromadzi się w dużych ilościach jest jądro komórkowe. W chromatynie i DNA istnieje wiele miejsc, gdzie glin ulega podstawieniu. Jony tego metalu wykazują również duże powinowactwo do RNA (Boni i wsp. 1980, Karlik i wsp. 1980). Udowodniono, że aluminium zaburza syntezę DNA, obniża RNA w nerwiaku, redukuje informacyjny RNA kodujący we włóknach nerwowych, blokuje aktywność polimerazy RNA *in vitro*, zmienia ilość poly-(A)RNA w mózgu (Gra-

czyk, Długaszek 1993). Tym samym może pośrednio wpływać na syntezę enzymów lizosomalnych.

Nieco inaczej przedstawia się aktywność esterazy lizosomalnej w mięśniu sercowym i mięśniu szkieletowym. Zanotowano, w przypadku tych narządów, wzrost aktywności badanego enzymu, w stosunku do wszystkich grup wcześniejszych. Zakres zmian aktywności enzymów lipolitycznych zależy od wielkości zmian w samych narządach i tkankach (Schmidt i wsp. 1969). Jak stwierdzono już wcześniej, glin gromadzi się w pierwszej kolejności w wątrobie, nerkach, śledzionie, tkance kostnej i mózgu.

W mięśniu sercowym i w mięśniach szkieletowych zaczyna się on kumulować w większych ilościach wówczas, gdy uszkodzone zostaną wyżej wymienione organy (Boegman, Bates 1984, Graczyk, Długaszek 1993).

Nie ma dużych różnic w reaktywności samic i samców. Zwierzęta obu płci reagują bardzo podobnie.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że chlorek glinu, w zależności od czasu trwania iniekcji pobudza różne reakcje metaboliczne, efektem czego są zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w badanych narządach, co wykazano w niniejszej pracy.

## Literatura

- Alfrey A.C., 1980, *Aluminium metabolism in uremia* Neurotoxicology, 1, 43.
- Alfrey A.C., 1984, *Aluminium intoxication* New Engl. J. Med. 310, 1113.
- Alfrey A.C., 1993, *Aluminium toxicity in patients with chronic renal failure*. Therapeutic Drug Monitoring, 15, 6.
- Berry J.P., Meignan M., Escaig P., Galle P., 1988, *Inhaled soluble aerosols insolubilised by lysosomes of alveolar cells. Application to some toxic compounds: electron microprobe and ion microprobe studies*. Toxicology, 52 (1-2), 127.
- Birchall J.D., Chappel J.S., 1988, *Aluminium, chemical physiology and Alzheimer's disease*, Lancet, 2, 1008.
- Boegman R.J., Bates L.A., 1984, *Neurotoxicity of aluminium* Can. J. Physiol Pharmacol, 62, 1010.
- Boni U., Seger M., Crapper-McLachlan, 1980, *Functional consequences of chronic bound aluminium in cultured human cells*. Aluminium Neurotoxicity (red. Liss L.) Pathotox, Park Forest South.
- Crapper-McLachlan D.R., de Boni U. 1980, *Aluminium in human brain disease: an overview* Neurotoxicology, 1, 3.

- Dunn W.A., 1990, *Studies on the mechanisms of autophagy. Formation of the autophagic vacuole* J. Cell Biology, 110, 1923.
- Dunn W.A., 1990, *Studies on the mechanisms of autophagy. Maturation of the autophagic vacuole* J. Cell Biology, 110, 1935.
- Erasmus R.T., Savory J., Wills M.R., Herman M.H., 1993, *Aluminium neurotoxicity in experimental animals*. Therapeutic Drug Monitoring, 15, 588.
- Ficek W., Holik-Januś B., 1994, *Zmiany morfostrukturalne oraz poziom magnezu w granicy szczura po podaniu soli glinu*. Materiały III Sympozjum nt. *Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej* (Kraków).
- Galle P., Chatel M., Berry J.P., Menault F., 1979, *Progressive myoclonic encephalopathy in dialysis patients: presence of high concentrations of aluminium in the lysosomes of the cerebral cells*. Nouv. Press. Med. 8(50), 4091.
- Galle P., Giudicelli C.P., 1982, *Electron microprobe ultrastructural localization of aluminium in hepatocyte*. Nouv. Press. Med. 11(15), 1123.
- Galle P., Campos H., Chadenas D., 1987, *Abnormal concentration of aluminium in the lysosomes of a primary parathyroid adenoma*. Ann. Pathol., 7(1), 65.
- Głuszek J., 1987, *Toksyczne działanie glinu w przewlekłej niewydolności nerek*. Polski Tyg. Lek., 48, 1499.
- Graczyk A., Długaszek M., 1993, *Procesy biochemiczne i mechanizmy molekularne toksyczności glinu* Roczn. PZH, 1, 23.
- Humbert W., Aprahamian M., Stock C., Grenier J.P., 1982, *Copper accumulation in primary biliary cirrhosis. An electron and X-ray microanalytical study*. Histochemistry, 74(1), 85.
- Johnson G.V.W., Jope R.S., 1986, *Aluminium impairs glucose utilization and cholinergic in rat brain in vitro*. Toxicology, 40, 93.
- Kamiński M., 1989, *Struktura i funkcje neuronu*, w: *Fizjologia i farmakologia błony komórkowej*. Instytut Farmakologii PAN Kraków.
- Karlik S.J., Eichhom G.L., Lewis P.N., Crapper-McLachlan D.R., 1980, *Interaction of aluminium species with deoxyribonucleic acid* Biochemistry, 23, 5991.
- Klassing J., 1988, *Influence of stress on protein metabolism*, in: *Animal stress*. Amer. Physiol. Soc. Maryland.
- Król T., 1994, *Aktywność wybranych enzymów lizosomalnych w hepatocytach myszy po obciążeniu winkrystyną*. Materiały III Sympozjum nt. *Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej*, Kraków.
- Kulczycki J., 1993, *Rola glinu w etiopatogenezie zaburzeń neurologicznych*. Roczn. PZH, 1, 49.
- Lai J.C., Blass J.P., 1984, *Inhibition of brain glycolysis by aluminium*. J. Neurochemistry, 42, 438.



- Laske V., Stein G., Müller A., Bräunlich H., Fleck C., Linss W., *The effect of chronic aluminium loading on lysosomal enzymes in serum and organ homogenates*. Pharmazie, 44(3), 218.
- Linss V.W., Martin R., Stein G., Bräunilch H., Fleck C., 1991, *Electron microscopic evidence of aluminium in lysosomes of kidney cells by electron energy loss spectroscopy*. Acta Histochem, 90(1), 65.
- Linss V.W., Martin R., Stein G., Bräunilch H., Fleck C., 1992, *The occurrence of aluminium containing lysosomes in the kidney of experimentally treated rats*. Acta Histochem. Suppl., 42, 273.
- Ludwicki J.K., 1993, *Toksykologia glinu*, Roczn. PHZ, 1, 15.
- Miyawaki T., 1988, *The lysosomal stabilizing effects of some antishock agents*. Eng. Abstr., 37/7, 825.
- Najda J., Gmiński J., 1992, *Krzem w patofizjologii ośrodkowego układu nerwowego*. Pol. Tyg. Lek., 20–21, 459.
- Olanow C.W., 1993, *A rationale for monoamine oxidase inhibition as neuroprotective therapy for Parkinson's disease*. Movement Disorders Suppl, 1, 81.
- Schmidt M., Dmochowski A., Laskowski S., Czarniecki M., 1969, *Badania biochemiczne nad fizjopatologiczną rolą lizosomów*. Pol. Tyg. Lek., 24, 224.
- Srebro Z., Lach H., 1994, *Bioenergetics, Aging and Neurodegenerative Diseases*. Wyd. Nauk. WSP, Kraków.
- Stein G., Laske V., Müller A., Bräunlich H., Linss W., Fleck C., *Aluminium induced damage of the lysosomes in the liver, spleen and kidneys of rats*. J. Appl. Toxicol., 7(4), 253.
- Sternlieb I., Goldfischer S., 1976, *Heavy metals and lysosomes*, in: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Dingle J., Fell H. (wyd.) Amsterdam vol. 5.
- Śląski J., *Aluminium and metabolism of some plant and animal organisms* Roczn. PZH, 1, 7.
- Tokutake S., Nagase H., Morisaki S., Oyanagi S., 1995, *Aluminium detected in senile plaques and neurofibrillary tangles is contained in lipofuscin granules with silicon, probably as aluminosilicate*. Neurosciences Letters, 185, 99.
- Zaman K., Zaman A., Batcabe J., 1994, *Hematological effects of aluminium on living organisms*. Comparative Biochemistry and Physiology-Comparative Pharmacology and Toxicology, 285.

*Krystyna Mnich, Dorota Wielgus*

**Evaluation of the Activity of Lysosomal Esterase  
in Certain Organs and Tissues  
of Animals Injected with *Aluminium chloride***

**S u m m a r y**

The activity of lysosomal esterase (EL) was estimated in the brain, liver, kidney, skeletal and heart muscles of mice injected with 50 mg/kg of body weight aluminium chloride for 7, 14, and 21 days.

The results obtained showed increased activity of the enzyme in all analysed organs and tissues of the mice treated with the drug for seven days. Comparing to this, fourteen days treatment of mice with aluminium chloride decreased the activity of lysosomal esterase. The injection of aluminium chloride into the mice for twenty one days caused once again on enhancement of esterase activity.

The changes in the activity of lysosomal esterase in some organs and tissues of mice treated with aluminium chloride were discussed.