

Maciej Barzdo, Ewa Gloc, Ewa Meissner, Agnieszka P. Jurczyk, Beata Jankowska, Jarosław Berent, Stefan Szram

Zmiany stężeń produktów peroksydacji lipidów i grup tiolowych w mózgach szczurów w przebiegu przewlekłej intoksykacji metanolem

Changes of the concentration of lipid peroxidation products and thiol groups in rat brains with long-term intoxication with methanol

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. S. Szram

Za toksyczne działanie metanolu odpowiedzialne są głównie jego metabolity, których powstawaniu może towarzyszyć generowanie reaktywnych form tlenu. Celem pracy było określenie wpływu przewlekłej intoksykacji metanolem na zmiany stężeń końcowych produktów peroksydacji lipidów, reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARs) oraz wolnych grup tiolowych (-SH) w mózgach szczurów, jako wykładników stresu oksydacyjnego w tym narządzie. Przeprowadzone badania nie wykazały jednak istotnych statystycznie zmian stężeń TBARs oraz grup -SH w mózgach szczurów. Wyniki te wskazują na brak zdolności metanolu do generowania reaktywnych form tlenu w mózgach szczurów w przebiegu przewlekłej intoksykacji.

The aim of this paper was to define the influence of long-term methanol intoxication on the changes of end products of lipid peroxidation, reacting with thiobarbituric acid (TBA-reactive products) and free SH-group concentration in rat brains. The experiment was conducted on male Lewis rats. The experimental groups received a 1-molar methanol solution and the control group received tap water. The animals were killed after 4, 8 and 12 weeks of intoxication and their brains were collected for further examination, which encompassed measurement of the concentration of TBA-reactive products and free SH-groups. The revealed changes of TBA-reactive products and free SH-group concentration were not statistically significant.

Słowa kluczowe: metanol, stres oksydacyjny, TBARs, wolne grupy SH
Key words: methanol, oxidative stress, TBA-reactive products, free SH-groups

WPROWADZENIE

Przewlekłe zatrucia metanolem zdarzają się rzadko i najczęściej związane są z narażeniem zawodowym. Potencjalne zagrożenie przewlekłymi zatruciami może wiązać się z coraz szerszym stosowaniem metanolu, jako alternatywnego źródła energii [1]. Za toksyczne efekty działania metanolu odpowiedzialne są jego metabolity – formaldehyd i kwas mrówkowy – które wiążąc się z białkami powodują ich nieodwracalne uszkodzenie. Wyrazem tego są zmiany zwyrodnieniowe m.in. ośrodkowego układu nerwowego, nerwów wzrokowych, siatkówki. Kwas mrówkowy odpowiada ponadto za występującą w przebiegu zatrucia kwasicę metaboliczną. Powstawaniu tych metabolitów może towarzyszyć generowanie reaktywnych form tlenu, które mogą odgrywać pewną rolę w mechanizmach toksycznego działania metanolu [2-13].

CEL PRACY

Celem pracy było określenie wpływu przewlekłej intoksykacji metanolem na zmiany stężeń końcowych produktów peroksydacji lipidów, reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARs) oraz wolnych grup tiolowych (-SH) w mózgach szczurów, jako wykładników stresu oksydacyjnego w tym narządzie.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na samcach szczurów szczepu wsobnego Lewis, w początkowym wieku około 3 miesięcy. Grupa doświadczalna licząca 30 szczurów została podzielona na trzy równoliczebne podgrupy. Grupa porównawcza liczyła 10 szczurów. Zwierzęta grupy doświadczalnej otrzymywały do picia 1 M roztwór alkoholu metylowego, zaś zwierzętom grupy porównawczej podawano do picia wodę wodociągową. Szczury uśmiercano w 4, 8 i 12 tygodniu doświadczenia. Pobrane mózgi zwierząt zamrożono w temperaturze -80°C do dalszych badań biochemicznych, które obejmowały ocenę następujących parametrów stresu oksydacyjnego:

1. stężenia końcowych produktów peroksydacji lipidów, reagujących z kwasem tiobarbiturowym oznaczanych metodą spektrofluorymetryczną;
2. stężenia wolnych grup tiolowych oznaczanych metodą z odczynnikiem Ellmana.

Powyższe parametry stresu oksydacyjnego zostały podane w przeliczeniu na ilość białka oznaczonego metodą Lowry'ego.

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej w Łodzi do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (decyzja nr Ł/BD/53 z dnia 22.05.2001 r.).

WYNIKI

Stężenie TBARs w homogenatach mózgów szczurów intoksykowanych metanolem nie zmieniło się istotnie w trakcie trwania doświadczenia w stosunku do stężenia oznaczonego w grupie porównawczej. Stężenia te wynosiły w grupie porównawczej oraz w grupach badanych w 4, 8 i 12 tygodniu intoksykacji odpowiednio: $4,0 \pm 1,7$; $6,9 \pm 3,7$; $4,7 \pm 1,7$ i $7,6 \pm 4,7$ mM/mg. Wyniki przedstawiono w tabeli I.

Tab. I. Parametry statystyczne zmian stężenia TBARs w mózgach szczurów intoksykowanych metanolem.

Tab. I. The statistical parameters of the TBA-reactive products in the brains of rats intoxicated with methanol.

	Kontrola	4 tydzień	8 tydzień	12 tydzień
Średnia ($\mu\text{M}/\text{mg}$)	4,00	6,94	4,73	7,56
SD	1,72	3,71	1,65	4,70
Liczność	5	10	9	10
Min	1,05	1,48	1,60	3,34
Max	5,21	15,32	7,57	18,81

Stężenia wolnych grup tiolowych w homogenatach mózgów szczurów intoksykowanych metanolem nie zmieniły się istotnie w trakcie trwania doświadczenia w stosunku do stężenia oznaczonego w grupie porównawczej. Stężenia te wynosiły w grupie porównawczej oraz w grupach badanych w 4, 8 i 12 tygodniu intoksykacji odpowiednio: 107 ± 35 , 108 ± 56 , 278 ± 260 i 110 ± 73 mM/mg. Wyniki przedstawiono w tabeli II.

Tab. II. Parametry statystyczne zmian stężenia grup -SH w mózgach szczurów intoksykowanych metanolem.

Tab. II. The statistical parameters of the free SH-groups in the brains of rats intoxicated with methanol.

	Kontrola	4 tydzień	8 tydzień	12 tydzień
Średnia ($\mu\text{M}/\text{mg}$)	106,9	108,2	278,2	109,6
SD	35,4	56,1	260,4	73,4
Liczność	5	8	10	10
Min	57,0	55,2	2,0	42,1
Max	156,5	196,7	567,9	281,0

DYSKUSJA

Za toksyczne działanie metanolu odpowiedzialne są głównie jego metabolity, których powstawaniu może towarzyszyć generowanie reaktywnych form tlenu [4]. Badania przeprowadzone przez

Skrzydlewską i wsp. wykazały zmiany aktywności enzymów i stężeń związków antyoksydacyjnych (katalazy, peroksydazy i reduktazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, glutationu) oraz stężenia końcowych produktów peroksydacji lipidów w mózgach szczurów w przebiegu ostrej intoksykacji metanolem [11]. Toksyczne działanie metanolu związane z generowanym stresem oksydacyjnym stwierdzono również w wątrobie [3, 6-13] i erytrocytach [9, 10, 12]. Zdolność metanolu do generowania wolnych rodników została także stwierdzona w badaniach przeprowadzonych z zastosowaniem rezonansu paramagnetycznego i pułapek spinowych [2]. Metodami tymi wykazano wzrost stężenia rodnika $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ w żółci i moczu szczurów [5].

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują na brak zdolności metanolu do generowania reaktywnych form tlenu w mózgach szczurów w przebiegu przewlekłej intoksykacji. Może to sugerować, że toksyczne działanie metanolu na badany narząd nie ma związku z ewentualnie towarzyszącym jego metabolizmowi stresem tlenowym, bądź też sposób przeprowadzenia i zakres eksperymentu nie dały możliwości wykazania zdolności metanolu do generowania stresu oksydacyjnego w mózgach szczurów.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych statystycznie zmian stężeń TBARs oraz grup $-\text{SH}$ w mózgach szczurów. Wyniki te wskazują na brak zdolności metanolu do generowania reaktywnych form tlenu w mózgach szczurów w przebiegu przewlekłej intoksykacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Burbacher T., Shen D., Grant K., Sheppard L., Damian D., Ellis S., Liberato N.: Reproductive and offspring developmental effects following maternal inhalation exposure to methanol in nonhuman primates. *Res Rep Health Eff Inst.* 1999, 89, 1-133.

2. Castellanos M. M., Reyman D., Sieiro C., Calle P.: ESR-spin trapping study on the sonochemistry of liquids in the presence of oxygen. Evidence for the superoxide radical anion formation. *Ultrasound Sonochem.* 2001, 8, 17-22.

3. Datta N. J., Namasivayam A.: In vitro effect of methanol on folate-deficient rat hepatocytes. *Drug Alcohol Depend.* 2003, 71, 87-91.

4. Engerson T. D., McKelvey T. G., Rhyne D. B., Boggio E. B., Snyder S. J., Jones H. P.: Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest.* 1987, 79, 1564-1570.

5. Kadiiska M. B., Mason R. P.: Acute methanol intoxication generates free radicals in rats: an ESR spin trapping investigation. *Free Radic Biol Med.* 2000, 28, 1106-1114.

6. Shen L. J., Zhang Z. J., Ou Y. M., Zhang H. X., Huang R., He Y., Wang M. J., Xu G. S.: Computed morphometric analysis and expression of alpha fetoprotein in hepatocellular carcinoma and its related lesion. *World J Gastroentero.* 2000, 6, 415-416.

7. Skrzydlewska E., Farbiszewski R.: Antioxidant status of liver, erythrocytes, and blood serum of rats in acute methanol intoxication. *Alcohol.* 1997, 14, 431-437.

8. Skrzydlewska E., Farbiszewski R.: Decreased antioxidant defense mechanisms in rat liver after methanol intoxication. *Free Radic Res.* 1997, 27, 369-375.

9. Skrzydlewska E., Farbiszewski R.: Lipid peroxidation and antioxidant status in the liver, erythrocytes, and serum of rats after methanol intoxication. *J Toxicol Environ Health A.* 1998, 53, 637-649.

10. Skrzydlewska E., Farbiszewski R.: Liver and serum antioxidant status after methanol intoxication in rats. *Acta Biochim Pol.* 1997, 44, 139-145.

11. Skrzydlewska E., Witek A., Farbiszewski R.: The comparison of the antioxidant defense potential of brain to liver of rats after methanol ingestion. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1998, 120, 289-294.

12. Skrzydlewska E.: Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in rats after methanol intoxication. *Rocz Akad Med Białymst.* 1996, 41, 397-404.

13. Takase S., Takada N., Enomoto N.: Different types of chronic hepatitis in alcoholic patients: does chronic hepatitis induced by alcohol exist? *Hepatology.* 1991, 13, 876-881.

Adres Autorów:

lek. med. Maciej Barzdo

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej UM w Łodzi

ul. Sędziowska 18a

91-304 Łódź

e-mail: mbarzdo@wp.pl