

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

Ocena parametrów stresu oksydacyjnego w mózgach szczurów przewlekłe intoksykowanych etanolem

Oxidative stress parameter analysis in rat brains during long-term ethanol intoxication

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

Wyniki badań klinicznych i eksperymentalnych wskazują na toksyczne działanie etanolu na ośrodkowy układ nerwowy. Metabolizm etanolu jest związany z generowaniem reaktywnych form tlenu, które mogą – przynajmniej częściowo – leżeć u podstaw neurotoksycznego działania etanolu. Celem pracy było określenie wpływu przewlekłej intoksykacji etanolem 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. Wykazano istotny statystycznie wzrost stężenia TBARs w 4 tygodniu intoksykacji oraz istotny statystycznie spadek stężenia grup -SH w 8 i 12 tygodniu intoksykacji.

The aim of this research was to define the influence of long-term ethanol intoxication on the changes in end products of lipid peroxidation, reacting with thiobarbituric acid (TBA-reactive products) and free SH-groups concentrations in rat brains. The experiment was conducted on male Levis rats. The experimental groups received a 1-molar ethanol 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, encompassing measurement of the concentration of TBA-reactive products and free SH-groups. A statistically significant increase in the concentration of TBA-reactive products in 4th week of intoxication and decrease in the concentration of free SH-groups in 8th and 12th week of intoxication – compared to the control group – was noticed.

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

WPROWADZENIE

Przewlekłe nadużywanie etanolu prowadzi do różnorodnych zmian czynnościowych i morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym. Mechanizmy leżące u ich podłoża nie są dokładnie poznane, ale – przynajmniej częściowo – mogą być związane z działaniem reaktywnych form tlenu (RFT). W procesie metabolizmu alkoholu etylowego może dochodzić do generacji RFT, co może prowadzić do podwyższenia stacjonarnych ich stężeń i zaburzenia homeostazy, czyli rozwoju stresu oksydacyjnego [1, 4, 15, 16]. Stężenia RFT zależą od równowagi pomiędzy szybkością ich wytwarzania, a stężeniem antyoksydantów niskocząsteczkowych oraz aktywnością enzymów ochronnych. Zwiększenie szybkości wytwarzania RFT, np. w wyniku działania ksenobiotyków, prowadzi do wzmożenia procesów uszkadzających liczne składniki komórkowe – błony lipidowe, kwasy nukleinowe i białka [3, 9]. Istnieje wiele teorii dotyczących generacji stresu tlenowego przez alkohol etylowy. Dehydrogenaza alkoholowa może generować rodniki wodoronadtlenko-

we (HO_2), natomiast enzymy mikrosomalne rodnik wodorotlenowy. Procesy metabolizmu aldehydu octowego z udziałem oksydazy aldehydowej lub ksantynowej są również źródłem reaktywnych form tlenu [8]. W toku metabolizmu etanolu powstają również rodniki hydroksyetylowe [14]. Etanol może ponadto ułatwiać uwalnianie żelaza z białek magazynujących, umożliwiając zachodzenie reakcji Fentona, a także poprzez wpływ na mitochondria przyczynić się do zwiększenia jednoelektronowej redukcji tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego [17, 18].

CEL PRACY

Celem pracy było określenie wpływu przewlekłej intoksykacji etanolem 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 etylowego, 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 mózgow szczurów intoksykowanych etanolem wzrosło w sposób istotny statystycznie w 4 tygodniu intoksykacji do wartości $8 \pm 3 \mu\text{M}/\text{mg}$ ($p < 0,05$) w stosunku do stężenia oznaczonego w grupie odniesienia ($4 \pm 2 \mu\text{M}/\text{mg}$). W 8 i 12 tygodniu obserwowano nieistotny statystycznie spadek do wartości odpowiednio $3 \pm 2 \mu\text{M}/\text{mg}$ i $1 \pm 1 \mu\text{M}/\text{mg}$. Wyniki przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Parametry statystyczne zmian stężenia TBARs w mózgach szczurów intoksykowanych etanolem.

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

	Kontrola	4 tydzień	8 tydzień	12 tydzień
Średnia ($\mu\text{M}/\text{mg}$)	3,99	7,97	2,71	1,28
SD	1,72	3,18	2,32	1,28
Liczność	10	10	10	10
Min	1,05	4,03	0,37	0,42
Max	5,211	3,89	5,57	4,74
p	–	<0,05	>0,05	>0,05

Stężenie grup -SH w homogenatach mózgow szczurów intoksykowanych etanolem nie zmieniło się istotnie w 4 tygodniu doświadczenia, w stosunku do stężenia oznaczonego w grupie odniesienia. Natomiast stężenie wykazane w 8 i 12 tygodniu było znacznie mniejsze i wynosiło odpowiednio $16 \pm 26 \mu\text{M}/\text{mg}$ ($p < 0,001$) i $26 \pm 6 \mu\text{M}/\text{mg}$ ($p < 0,01$), w porównaniu z grupą odniesienia, gdzie wynosiło $107 \pm 35 \mu\text{M}/\text{mg}$. Wyniki przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Parametry statystyczne zmian stężenia grup-SH w mózgach szczurów intoksykowanych etanolem.

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

	Kontrola	4 tydzień	8 tydzień	12 tydzień
Średnia ($\mu\text{M}/\text{mg}$)	106,9	123,3	15,8	26,1
SD	35,4	29,5	26,1	5,7
Liczność	10	10	10	10
Min	57,0	74,9	0,1	16,6
Max	156,5	171,5	75,7	33,1
p	–	>0,05	<0,001	<0,01

DYSKUSJA

Wyniki badań klinicznych i eksperymentalnych wskazują na toksyczny efekt ostrej i przewlekłej intoksykacji etanolem, w przebiegu której może dochodzić do zaburzeń czynnościowych i strukturalnych ośrodkowego układu nerwowego [6, 10, 13, 20]. Metabolizm etanolu jest związany z powstawaniem reaktywnych form tlenu [2], a także z zaburzeniami w oksydacyjnych przemianach zachodzących w mitochondriach [5, 12, 13]. Procesy te mogą leżeć u podłoża uszkodzeń w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy wskazują na obniżenie stężenia grup tiolowych w mózgu szczurów, a także zwiększenie stężenia produktów peroksydacji lipidów w czasie przewlekłej intoksykacji. Wskazuje to na możliwość generowania przez etanol stresu tlenowego w tym narządzie. W pracy opublikowanej przez Eysseric i wsp. [4] przedstawiono wyniki wskazujące na zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych – katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej – w astrocytach pochodzących z hodowli komórkowych, przy jednoczesnym zmniejszeniu stężenia glutationu. Również Huentelman i wsp. [7] stwierdzili zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu i zmniejszenie żywotności komórek nerwowych hodowanych w obecności etanolu. Wyniki innych prac prowadzonych na ciężarnych szczurach potwierdzają wzrost stężenia końcowych produktów peroksydacji lipidów u szczurów pojonych alkoholem etylowym [11] lub też wzrost stężenia rodnika hydroksylowego [19].

WNIOSKI

Przeprowadzone badania wykazały istotne statystycznie zmiany stężenia produktów peroksydacji lipidów oraz grup tiolowych w mózgu szczurów intoksykowanych alkoholem etylowym. Wyniki te mogą wskazywać na zdolność etanolu do generowania stresu oksydacyjnego w tym narządzie, w przebiegu przewlekłej intoksykacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Antonenkov V. D., Pirozhkov S. V., Popova S. V., Panchenko L. F.: Effect of chronic ethanol, catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole and clofibrate treatment on lipid peroxidation in rat myocardium. *Int. J. Biochem.* 1989, 21, 1313-1318.
2. Bondy S. C.: Ethanol toxicity and oxidative stress, *Toxicol. Lett.* 1992, 63, 231-241.
3. Cakatay U., Telci A., Kayali R., Tekeli F., Akcay T., Sivas A.: Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin. Biochem.* 2003, 36, 51-55.
4. Eysseric H., Gonthier B., Soubeyran A., Richard M. J., Daveloose D., Barret L.: Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol Alcohol.* 2000, 21, 117-125.
5. Foley T. D., Rhoads D. E.: Effects of ethanol on Na-dependent amino acid uptake: dependence on rat age and Na, K-ATPase activity. *Brain Res.* 1992, 593, 39-44.
6. Harper C., Kril J.: If you drink your brain will shrink. *Neuropathological considerations. Alcohol Alcohol.* 1991, 1, 375-380.
7. Huentelman M. J., Peters C. M., Ervine W. E., Polutnik S. M., Johnson P.: Ethanol has differential effects on rat neuron and thymocyte reactive oxygen species levels and cell viability. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1999, 124, 83-89.
8. Kato S., Kawase T., Alderman J., Inatomi N., Lieber C. S.: Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology* 1990, 98, 203-210.
9. Koken T., Serteser M., Kahraman A., Gokce C.: Oxidative stress markers in hepatitis C infected hemodialysis patients. *J. Nephrol.* 2002, 15, 302-307.
10. Martin B. R., Compton D. R., Contemporary drug abuse, in: Craig C. R., Stitzel R. E. (Eds.): *Modern Pharmacology with Clinical Applications*, Little Brown and Company, Boston, MA, 1997, 429-451.
11. Muresan C., Eremia I.: Ethanol stimulates the formation of free oxygen radicals in the brain of newborn rats. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 1997, 43, 113-117.
12. Novack R. L., LaManna J. C., Rosenthal M.: Ethanol and acetaldehyde alter brain mitochondrial redox responses to direct cortical stimulation in vivo. *Neuropharmacology* 1982, 21, 1051-1058.
13. Rawat A. K.: Effects of ethanol on brain metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1975, 56, 165-177.
14. Reinke L. A., Moore D. R., McCay P. B.: Mechanisms for metabolism of ethanol to 1-hydroxy-

ethyl radicals in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997, 348, 9-14.

15. Rybczyńska M.: Biochemiczne podstawy wolnorodnikowego uszkodzenia tkanek. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 1994, 48, 419-442.

16. Tindberg N., Ingelman-Sundberg M.: Cytochrome P-450 and oxygen toxicity. Oxygen-dependent induction of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver and lung. *Biochemistry* 1989, 28, 4499-4504.

17. Tsukamoto H., Horne W., Kamimura S., Niemela O., Parkkila S., Yla-Herttuala S., Brittenham G. M.: Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J. Clin. Invest.* 1995, 96, 620-630.

18. Turrens J. F., Boveris A.: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 1980, 191, 421-427.

19. Vallett M., Tabatabaie T., Briscoe R. J., Baird T. J., Beatty W. W., Floyd R. A., Gauvin D. V.: Free radical

production during ethanol intoxication, dependence, and withdrawal. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1997, 21, 275-285.

20. Wallgren H.: Effect of ethanol on intracellular respiration and cerebral function, in: Kissin B., Beagleiter H. (Eds.), *The Biology of Alcoholism*, Plenum Press, New York, London, 1971, 103-125.

Adres do korespondencji:

lek. med. Maciej Barzdo

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej UM w Łodzi

ul. Sędziowska 18a

91-304 Łódź

e-mail: mbarzdo@wp.pl