

Agnieszka P. Jurczyk, Piotr Gałęcki, Józef Kędziora*, Beata Jankowska, Ewa Meissner, Janusz Śmigielski, Jarosław Berent, Stefan Szram

Wpływ wybranych alkoholi na procesy pro- i antyoksydacyjne w krwinkach czerwonych szczurów

Influence of selected alcohols on the pro and antioxidative processes in rat erythrocytes

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UM w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. S. Szram

* Z Kliniki Psychiatrii i Zaburzeń Nerwicowych UM w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. A. Florkowski

** Z Katedry i Zakładu Biochemii AM w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr hab. J. Kędziora

*** Z Zakładu Informatyki i Statystyki Medycznej UM w Łodzi

Kierownik: dr n. med. J. Kaczmarek

Celem naszych badań była ocena stężenia związków tiobarbiturozależnych (TBARS) jako wykładnika peroksydacji lipidów oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w erytrocytach szczurów w przewlekłej intoksykacji alkoholem metylovym lub etylowym. Długotrwałe podawanie roztworów etanolu lub metanolu powoduje obniżenie aktywności antyoksydantów komórkowych (dysmutazy, katalazy) oraz podwyższenie stężeń TBARS.

In forensic medicine practice poisonings are rather frequent, and among them, those caused by fatal „substitution” of ethyl alcohol. One of the most frequently encountered „substitutes” for ethyl alcohol is methanol. The purpose of our research was to determine the concentration of malonic dialdehyde as the expression of lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity after dosed chronic ethyl and methyl alcohol intoxication. The experiment was conducted on approx. 6 month-old male inbred Lewis rats each weighing approx. 250 g. Ethanol and methanol solution was given in the concentration 1,0 M. The control group of rats received water. Each experimental group numbered 30 rats, this number was divided into three sub-groups, which were put-down at 4, 8 and 12 weeks. The activity of superoxide dismutase (CuZn-SOD) was determined by the Misra-Fridovich method, catalase (CAT) by the Beers-Sizer method. The concentration of malonic dialdehyde (MDA) was determined using the method of Placer et al. by assessing the concentration of TBARS compounds. Results are expressed as a mean

+/- SD. The paired Student's test for small groups were used. Superoxide dismutase SOD1 activity decreased compared with the control group throughout the duration of the experiment from 2212 U/gHb to 1676 U/gHb for ethanol and from 2212 U/gHb to 945 U/gHb for methanol. Catalase activity for methanol decreased from 9,1 U/gHb to 5,1 U/gHb, for ethanol to 7,4 U/gHb. In the 4th week of the experiment increase of malonyl dialdehyde concentration for methanol group was observed - from 0,14 umol/gHb to 0,34 umol/gHb; after 8th weeks it decreased to 0,2 umol/gHb and in the 12th week increased to 0,23 umol/gHb. For ethanol these changes were less visible and reached the level of 0,24 umol/l. The statistical processing of the results was performed on the basis of parametric tests (the t-Student test for small experiments) and computer software Statistica. The statistical significance was set for $p < 0,05$.

Słowa kluczowe: metanol, etanol, wolne rodniki, stres oksydacyjny, bariera antyoksydacyjna

Key words: methanol, ethanol, free radicals, oxidative stress, antioxidative barrier

WSTĘP

Od wielu lat zatrucia alkoholem niekonsumpcyjnymi stanowią poważny problem. Są to zarówno intoksykacje przypadkowe, jak i celowe - samobójcze, lub zbrodnicze. Te drugie należą do rzadkości w Polsce. W piśmiennictwie światowym ocenia się, że od 50 do 80% ma podłoże samobójcze, pozostałe mają charakter przypadkowy i przeważnie są związane z nadużywaniem alkoholu. Obok glikolu etylenowego często spotykanym „substytutem” etanolu jest metanol. (9, 12). W Polsce metanol stał się ostatnio jedną z najczęściej występujących przyczyn zatruc, przy czym liczba ta systematycznie rośnie. Postacie ostrego zatrucia alkoholem metylowym są dobrze poznane i opisane. Jednakże ze względu na szeroki wachlarz produktów zawierających ten alkohol istnieje możliwość powstawania przewlekłych zatruc tą substancją (10,13).

Wszystkie medyczne konsekwencje używania i nadużywania wyżej wymienionych alkoholi mają swoje wytłumaczenie w zjawiskach zachodzących na poziomie tkankowym, komórkowym i molekularnym (1).

W czasie intoksykacji etanolem lub metanolem dochodzi do niedotlenienia (17). Zjawisko to prowadzi do aktywacji zależnych od jonów wapnia proteaz. Jedną z nich, prawdopodobnie calpina powoduje transformację dehydrogenazy ksantynowej do oksydazy ksantynowej (10). Dehydrogenaza ksantynowa jest enzymem katalizującym utlenianie substratów przez NAD^+ , co prowadzi do powstania $NADH$ i nie wiąże się z generacją reaktywnych form tlenu. Oksydaza ksantynowa natomiast przekazuje elektrony na tlen cząsteczkowy zamiast na NAD^+ . W wyniku tego procesu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru. Powstające w czasie utleniania alkoholi aldehydy są w cytozolu substratami oksydazy ksantynowej. Te same aldehydy poprzez reakcje z wolnymi grupami sulfhydrylowymi enzymu mogą powodować konwersję dehydrogenazy ksantynowej w oksydazę ksantynową (17). Ponieważ $NADH$

hamuje aktywność dehydrogenazy, obniżenie stosunku $NAD^+/NADH$ indukowane przez ostre zatrucie etanolem, może także przyspieszać konwersję tego enzymu (7).

Należy podkreślić, że intoksykacja alkoholem prowadzi w końcowym efekcie do produkcji ogromnej ilości wysoce reaktywnych form tlenowych pod postacią wolnych rodników ponadtlenkowych. Te z kolei bądź działają bezpośrednio na struktury komórkowe powodując peroksydację lipidów i uszkodzenie struktur komórkowych, bądź wchodzi w inne reakcje np. z wolnymi jonami żelaza powodując powstawanie pochodnych bardziej reaktywnych form tlenowych takich jak rodnik hydroksylowy (13).

CEL PRACY

Problematyka ostrych zatruc zarówno metanolem jak i etanolem jest stosunkowo dobrze poznana i szczegółowo opisana. Jednakże stosunkowo skąpe są dane dotyczące parametrów stresu oksydacyjnego we krwi ludzi i zwierząt doświadczalnych przy przewlekłym podawaniu metanolu, a także porównania zmian jakie powoduje sam metanol i etanol. Dlatego też, celem naszych badań była ocena stężenia TBARS jako wykładnika peroksydacji lipidów oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych po dozowanej intoksykacji alkoholem metylowym w porównaniu z etylowym. Materiałem do oceny w/w parametrów były erytrocyty krwi obwodowej.

MATERIAŁ I METODY

Eksperyment został przeprowadzony na szczurach szczepu wosbnego Lewis, samcach o masie ok. 250 g, w wieku ok. 6 miesięcy. Zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy, każda z grup otrzymywała inny rodzaj roztworu alkoholu do picia jako jedyny dostępny płyn. Pierwsza grupa otrzymywała roztwór etanolu, druga grupa otrzymywała roztwór metanolu. Wszystkie w/w roztwory podawano w stężeniu 1,0M, co stanowiło 1/10 DL50. Zwierzęta wypijały średnio 15-20 ml płynu na dobę. W grupie odniesienia podawano wodę. Zwierzęta przebywały przez całe doświadczenie w temperaturze 20°C, ze swobodnym dostępem do pokarmu (pasza granulowana Murigran), w cyklu 12 godzinnym dzień-noc. Każda z grup doświadczalnych liczyła 30, grupa odniesienia 10 szczurów. Zostały one podzielone na trzy równoliczebne podgrupy, które były uśmiercane w 4, 8, 12 tygodniu (po podaniu dootrzewnowo środka usypiającego - Vetbutal) przez otwarcie klatki piersiowej i pobranie krwi z serca do próbki z antykoagulantem (EDTA).

Uzyskaną masę erytrocytarną w ilości 2ml przemywano dwukrotnie w 0,9% roztworze NaCl. Krwinki czerwone hemolizowano wodą destylowaną (w stosunku 1:1) i zamrażano w temperaturze -20°C na okres 2 tygodni. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (CuZn-SOD) oznaczano metodą Misry i Fridovicha

(11), natomiast katalazy (CAT) metodą Beers'a i Sizera (2). Stężenie TBARS oznaczono metodą Placera i wsp. (14).

Doświadczenia 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.

Opracowania statystyczne wyników wykonano w oparciu o testy parametryczne (test t-Studenta dla małych prób) przy użyciu programu komputerowego Statistica. Istotność statystyczną oznaczano dla $p < 0,05$.

WYNIKI

Tabela I. Aktywność katalazy (U/gHb) w erytrocytach szczurów poddanych intoksykacji etanolem.

Table I. Catalase activity (U/gHb) in erythrocytes after ethanol intoxication.

| ETANOL | Grupa odniesienia | 4 tydzień | 8 tydzień | 12 tydzień |
|----------------------|-------------------|------------|-------------|------------|
| Średnia | 9,1 | 11,4 | 4,0 | 7,4 |
| SD | 1,1 | 1,8 | 0,7 | 1,4 |
| Liczba badanych | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Analiza statystyczna | | $p < 0,01$ | $p < 0,001$ | $p < 0,05$ |

Tabela II. Aktywność katalazy (U/gHb) w erytrocytach szczurów poddanych intoksykacji metanolem.

Table II. Catalase activity (U/gHb) in erythrocytes after methanol intoxication.

| METANOL | Grupa odniesienia | 4 tydzień | 8 tydzień | 12 tydzień |
|----------------------|-------------------|------------|-------------|-------------|
| Średnia | 9,1 | 8 | 5,4 | 5,1 |
| SD | 1,1 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |
| Liczba badanych | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Analiza statystyczna | | $p < 0,05$ | $p < 0,001$ | $p < 0,001$ |

Wyniki naszych obserwacji jednoznacznie wskazują na istotny spadek aktywności katalazy, występujący zwłaszcza w 8 tygodniu trwania eksperymentu. Obserwowano ten kierunek zmian zarówno w przypadku intoksykacji etanolem, jak i metanolem. Obniżenie aktywności katalazy podczas intoksykacji oboma związkami utrzymuje się do 12 tygodnia, jednak podczas stosowania etanolu jest wyższa.

Tabela III. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (U/gHb) w erytrocytach szczurów poddanych intoksykacji etanolem.

Table III. Dysmutase (SOD-1) activity (U/gHb) in erythrocytes after ethanol intoxication.

| ETANOL | Grupa odniesienia | 4 tydzień | 8 tydzień | 12 tydzień |
|----------------------|-------------------|------------|-------------|-------------|
| Średnia | 2212 | 2078 | 1796 | 1676 |
| SD | 233 | 189 | 255 | 195 |
| Liczba badanych | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Analiza statystyczna | | $p > 0,05$ | $p < 0,001$ | $p < 0,001$ |

Tabela IV. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (U/gHb) w erytrocytach szczurów poddanych intoksykacji metanolem.

Table IV. Dysmutase (SOD-1) activity (U/gHb) in erythrocytes after methanol intoxication.

| METANOL | Grupa odniesienia | 4 tydzień | 8 tydzień | 12 tydzień |
|----------------------|-------------------|------------|-------------|-------------|
| Średnia | 2212 | 1870 | 1166 | 945 |
| SD | 233 | 481 | 416 | 424 |
| Liczba badanych | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Analiza statystyczna | | $p < 0,05$ | $p < 0,001$ | $p < 0,001$ |

W wynikach obserwujemy wyraźny spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach w 8 i 12 tygodniu intoksykacji alkoholem etylowym. Podobnie intoksykacja metanolem spowodowała istotny spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, nasilający się zwłaszcza w 8 tygodniu badania. Kontynuacja eksperymentu nie wpłynęła na dalsze zmiany aktywności tego enzymu.

Tabela V. Wartości stężenia TBARS (umol/gHb) w erytrocytach szczurów poddanych intoksykacji etanolem.

Table V. TBARS concentration (umol/gHb) in erythrocytes after ethanol intoxication.

| ETANOL | Grupa odniesienia | 4 tydzień | 8 tydzień | 12 tydzień |
|----------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| średnia | 0,14 | 0,2 | 0,24 | 0,24 |
| SD | 0,02 | 0,04 | 0,05 | 0,05 |
| Liczba badanych | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Analiza statystyczna | | $p < 0,001$ | $p < 0,001$ | $p < 0,001$ |

Tabela VI. Wartości stężenia TBARS (pmol/gHb) w erytrocytach szczurów poddanych intoksykacji metanolem.

Table VI. TBARS concentration (j.mol/gHb) in erythrocytes after methanol intoxication.

| METANOL | Grupa odniesienia | 4 tydzień | 8 tydzień | 12 tydzień |
|------------------------|-------------------|-----------|-----------|------------|
| średnia | 0,14 | 0,34 | 0,2 | 0,23 |
| Odchylenie standardowe | 0,02 | 0,05 | 0,02 | 0,05 |
| Liczba badanych | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Analiza statystyczna | | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 |

Wyniki przeprowadzonych badań oceniające wpływ długotrwałej intoksykacji alkoholem metylowym lub etylowym wykazały istotny wzrost stężenia TBARS w erytrocytach.

DYSKUSJA

W praktyce sądowo-lekarskiej nierzadko można spotkać się z przypadkami, gdy przewlekła intoksykacja spowodowana jest mieszaniną alkoholi, bądź ich naprzemiennym użyciem. Z piśmiennictwa wynika, że zarówno u ludzi, jak i u zwierząt doświadczalnych nadmierna i przewlekła konsumpcja alkoholu etylowego doprowadza do przyspieszenia procesu peroksydacji lipidów wyrażonego wzrostem stężenia TBARS w erytrocytach, hepatocytach oraz komórkach OUN (3, 8). Jednakże warto zaznaczyć, że istnieją w piśmiennictwie także prace wskazujące, że stężenie TBARS po spożyciu etanolu nie zmieniało się (16). Znamienny wzrost stężenia TBARS będącego markerem peroksydacji lipidów, obserwowano także w erytrocytach w wyniku długotrwałej intoksykacji metanolem (18). O wiele częściej spotykana, np. podczas zatruc, ostra intoksykacja metanolem, również wyraża się znacznym przyspieszeniem procesu peroksydacji lipidów (15).

Medyczne skutki przewlekłego alkoholu etylowego i metylowego wynikać zatem mogą z ich prooksydacyjnego oddziaływania doprowadzającego do przyspieszenia procesu peroksydacji lipidów uszkadzającego struktury komórkowe.

Obok aktywności prooksydacyjnej w/w alkoholi ważnym z punktu widzenia równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej jest wydolność mechanizmów bariery antyoksydacyjnej. W badaniach własnych obserwujemy obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach. W wynikach badań innych autorów, odnotowuje się spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w tkance mózgowej i hepatocytach (4, 6, 8).

Dane piśmiennictwa dotyczące aktywności katalazy (CAT) są kontrowersyjne. D'Almeida i wsp. obserwowali spadek aktywności katalazy po 13 tygodniach spożywania 1,5g etanolu na kilogram masy ciała oraz powrót aktywności tego

enzymu do poziomu wyjściowego po dwumiesięcznym leczeniu (4). Natomiast Sozmen i wsp. wskazują na wyraźny wzrost aktywności katalazy w godzinę po intoksykacji etanolem (16). W badaniach własnych zauważamy spadek aktywności katalazy po intoksykacji metanolem. Intoksykacja etanolem w 12 tygodniu nie różni się istotnie statystycznie od wartości z grupy kontrolnej, choć w 8 tygodniu eksperymentu aktywność tego enzymu jest niższa. Można to tłumaczyć wyższą aktywnością enzymatyczną katalazy u szczurów niż u ludzi.

Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują na postępujące w trakcie przewlekłej intoksykacji metanolem lub etanolem upośledzenie enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej oraz przyspieszenie procesu peroksydacji lipidów.

WNIOSKI

1. Długotrwałe podawanie roztworów etanolu i metanolu powoduje obniżenie aktywności antyoksydantów komórkowych (dysmutazy, katalazy) w krwinkach czerwonych u szczurów,
2. Przewlekła intoksykacja roztworami alkoholu etylowego i metylowego powoduje podwyższenie stężenia dialdehydu malonowego w krwinkach czerwonych u szczurów, co mogłoby wskazywać na przyspieszenie procesów peroksydacji lipidów w erytrocytach zwierząt długotrwałe intoksykowanych stosowanymi alkoholami.

PIŚMIENNICTWO

1. Al.-Abrash A. S., Al.-Quobaili F. A., Al.-Akhras G. N.: Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative stress. *Saudi. Med. J.* 2000, 21(9), 826-830. -2. Beers R., Sizer T.: Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952, 195, 133-140. -3. Cestaro B., Simonetti P., Cervato G., Brusamolino A., Gatti P., Testolin G.: Red wine effect on peroxidation indexes of rat plasma and erythrocytes. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 1996, 47(2), 181-189. -4. D'Almeida V., Monteiro M. G., Oliveira M.G., Pomarico A. C., Bueno O. F., da Silva Fernandes M. E.: Long-lasting effects of chronic ethanol administration on the activity of oxidant enzymes. *J. Biochem. Toxicol.* 1994, 9(3), 141-143. -5. Ekstrom G., Ingelman-Sudenberg M.: Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol inducible cytochrom P-450 (P-450 IIE1). *Biochem. Pharmacol.* 1989, 38, 1313-1319. -6. Farbiszewski R., Makarewicz M., Chwiecko M., Kowalczyk T.: Ethanol ingestion decreases superoxide dismutase activity and diminishes -SH compounds in the liver and red blood cells in rats. *Rocz. Med. Białymst.* 1995, 40(2), 243-249. -7. Kato S., Kawase T.: Role of xantine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation. *Gastroenterology.* 1990, 47, 797-803. -8. Lindi C, Montorfano G., Marciari

P • Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake. Alcohol. 1998 Nov, 16(4), 311-316. -9. Liu A., Daya B., Mann H.: Methanol related deaths in Ontario. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 1999, 37(1), 69-73. 10. Mahieu P., Hassoun A.: Predictors of methanol intoxication with unfavorable outcome. Hum. Toxicol. 1989, 8, 135-137.

11. Misra H.P., Fridovich J.: The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 1972, 247, 3170-3173. -12. Nowicka J., Olszowy Z., Sybirska H.: Współczesne zamienniki alkoholu etylowego w praktyce Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Śl. A. M. w latach 1982-1991. Acta. Pol. Toxicol. 1993, 1, 18-23. -13. Pla A., Hernandez AF.: A fatal case of oral ingestion of methanol. Forensic Sci. Int. 1991, 49, 193-196. -14. Placer Z., Cushman L., Johnson B.: Estimation of product of lipid peroxidation malondialdehyde in biochemical systems. Anal. Biochem. 1966, 16, 359-364. -15. Skrzydlewska E., Farbiszewski R.: lipid peroxidation and antioxidant status in the liver. J. of Toxicol. Part A 53, 8. -16. Sozmen E. Y., Tanyalcin T., Onat T., Kutay F., Erlacin S.: Ethanol induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes. Eur. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1994, 32(10), 741-744. -17. Sultatos L. G.: Effects of acute ethanol administration on hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase system in rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1988, 246, 946-949. -18. Tephly T. R.: The toxicity of methanol. Life Sci. 1991, 36, 1031.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Sędziowska 18a
91-304 Łódź

Małgorzata Kłys, Sebastian Rojek, Mariusz Ścisłowski, Filip Bolechała, Adam Gross, Jan Kołodziej, Artur Moskała

Znaczenie analizy włosów w ocenie kompleksowych zatruc śmiertelnych lekami dla celów opiniowania sądowo-lekarskiego

Significance of hair analysis in the evaluation of complex drug - poisonings for medico-legal purposes

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej CM UJ
Kierownik : prof. dr hab. F. Trela

Spośród różnych materiałów alternatywnych wykorzystywanych w ekspertyzie toksykologicznej największe znaczenie mają włosy, w których odkładane ksenobiotyki stwarzają możliwość śledzenia historii ich zażywania w okresie określonym długością włosa. W pracy podjęto próbę nakreślenia kierunków zastosowania analizy włosów w toksykologii sądowej do celów opiniowania sądowo-lekarskiego poprzez ilustrację podjętego tematu czterema przypadkami kompleksowych zatruc śmiertelnych lekami, w których wykorzystano analizę włosów w ocenie toksykologicznej. Wykryte we włosach leki informują o stosowanej terapii farmakologicznej w konfrontacji z dawkami leków zażytych w celach samobójczych, potwierdzają model uzależnienia jak również dowodzą braku wymaganej abstinencji od alkoholu oraz narkotyku w terapii uzależnień.

Among various alternative materials used in toxicological analysis the most important is hair, in which xenobiotics deposited create a possibility to observe the history of their administration in the period determined by the hair - length. In this paper the authors have tried to outline the course of the application of hair analysis in forensic toxicology for medicolegal purposes. The undertaken subject has been recorded in four cases of complex drug poisonings in which hair analysis was used in the toxicological evaluation. Drugs detected in the hair of the examined subjects inform about the history of pharmacological therapy in confrontation with those administered in order to commit suicide. The analysis confirms a model of dependence and proves drinking of alcohol and use of cocaine during the pharmacological therapy of dependence.

Słowa kluczowe : materiały alternatywne, włosy, analiza toksykologiczna

Key words : alternative material, hair, toxicological analysis