

Agnieszka P. Jurczyk*, **Piotr Gałęcki****, **Beata Jankowska***,
Ewa Meissner*, **Stefan Szram***, **Paweł Fijałkowski****, **Jan**
Błaszczyk**, **Józef Kędziora****, **Janusz Śmigielski*****

Wpływ glikolu etylenowego na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i peroksydację lipidów w erytrocytach

Effect of ethylene glycol on antioxidative enzymes and lipid peroxidation activity in erythrocytes

* Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Łodzi

„ Kierownik: prof. dr hab. S. Szram

" Z Zakładu Fizjologii WAM w Łodzi

-Kierownik: prof. dr hab. J. Kędziora

Z Zakładu Informatyki i Statystyki Medycznej WAM w Łodzi

Kierownik: dr J. Kaczmarek

Celem badań było wykazanie zmian w aktywności enzymów tworzących barierę antyoksydacyjną oraz parametrów stresu oksydacyjnego w krwinkach czerwonych szczurów, którym podawano glikol etylenowy (GE) przez okres czterech tygodni.

Investigations were aimed at demonstrating changes in the activity of enzymes forming an antioxidative barrier and oxidative stress parameters in erythrocytes of rats which were administrated ethylene glycol during 4 weeks. Superoxide dismutase activity (CuZn-SOD) was evaluated by the Misra and Fridovich method, catalase (EC1.11.1.6.) by the Beers and Sizer method and malonyl dialdehyde concentration (MDA) with Placer et al were assessed in the obtained material through the evaluation of TBARS compounds concentration. In the 4th week of the experiment a decrease in catalase (9,3 U/gHb to 5,7 U/gHb) and superoxide dismutase (2378 U/gHb to 1759 U/gHb) activity was observed. Malonyl dialdehyde concentration increased from the initial 0,14 pmol/gHb to 0,24 umol/gHb. The investigations carried out have demonstrated that long-term intoxication with ethylene glycol leads to a constant generation of free radicals (increase of MDA concentration) and gradual exhaustion of the antioxidative system.

Słowa kluczowe: glikol etylenowy, wolne rodniki, bariera antyoksydacyjną, stres oksydacyjny, katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, dialdehyd malonowy, szczur, Lewis

Key words: ethylene glycol, free radicals, antioxidative barrier, oxidative stress, catalase, superoxide dismutase, malonyl dialdehyde, rat, Lewis

WSTĘP

W praktyce sądowo-lekarskiej i toksykologicznej ze spożywaniem alkoholu bardzo często związany jest problem zatrucia tak zwanymi „zamiennikami alkoholu etylowego”, do których należy glikol etylenowy (5, 13, 19). Jest on alkoholem dwuwodorotlenowym i wśród nich jest najbardziej toksycznym związkiem. Zatrucie nim jest stosunkowo częste w naszym kraju, a liczba tych zatruc nadal systematycznie rośnie. Z piśmiennictwa wynika, że w krajach wysoko rozwiniętych intoksykacje glikolem etylenowym należą obecnie już do rzadkości (8, 10). Toksyczność niezmetabolizowanego glikolu etylenowego nie różni się wiele od toksyczności etanolu, jednak produkty jego degradacji są w bardzo wysokim stopniu toksyczne. Degradacja oksydacyjna odbywa się głównie w wątrobie i zapoczątkowana jest przez dehydrogenazę alkoholową. Powstają kolejno aldehyd glikolowy, kwas glikoksalowy 1 bardzo toksyczny kwas szczawiowy, choć jego ilość wytworzona wynosi tylko od ok. 2 do 5% ilości spożytego glikolu etylenowego (1, 4). Najbardziej toksycznymi metabolitami są aldehyd glikolowy i kwas szczawiowy. Aldehyd glikolowy głównie zakłóca procesy energetyczne w mózgu, jak i zaburza syntezę DNA i RNA (21) oraz serotoniny. W procesie tym dochodzi do uszkodzenia naczynia włosowatego, co prowadzi do obrzęku i wybroczyn, głównie w tkance mózgowej (3, 4, 6, 7, 16, 20). Powstająca w czasie oksydacji znaczna liczba jonów H⁺ wraz z nagromadzeniem kwasów glikolowego, glioksalowego, szczawiowego, a także zapewne mlekowego i pirogronowego wywołuje ciężką kwasicę metaboliczną (7, 14, 15, 18). Znany jest uszkodzający wpływ glikolu etylenowego na komórki i tkanki ssaków, natomiast bardzo fragmentaryczne i kontrowersyjne, są dane dotyczące oddziaływania tego związku na enzymy antyoksydacyjne i peroksydację lipidów w tkankach.

Mając na uwadze wysoką toksyczność glikolu etylenowego, postanowiono prześledzić zachowanie się aktywności enzymatycznej dysmutazy i katalazy oraz stężenie dialdehydu malonowego w krwi czerwonej po dozowanym podaniu glikolu etylenowego u szczurów.

MATERIAŁ I METODA

Eksperyment został przeprowadzony na szczurach szczepu wsobnego Lewis (które są modelowym zwierzęciem dla doświadczeń z użyciem środków uzależniających), samcach o masie ok. 250g, w wieku ok. 6 miesięcy, którym był podawany glikol etylenowy w roztworze 1 molowym jako jedyny dostępny płyn. Zwierzęta wypijały średnio 15-20 ml płynu na dobę, a w schyłkowym okresie 5-10 ml. W grupie kontrolnej (K) była podawana woda. Zwierzęta przebywały przez całe doświadczenie w temperaturze 20°C, ze swobodnym dostępem do pokarmu (pasza granulowana Murigran), w cyklu 12-to godzinny dzień-noc. Grupa doświadczalna (G) została podzielona na trzy podgrupy, identycznie jak w innych jednostkach doświadczalnych (9) z podobnym założeniem uśmiercenia w 4, 8, 12 tygodniu (po podaniu dootrzewnowo środka usypiającego - Vetbutal) przez otwarcie klatki piersiowej i pobranie krwi z serca do heparynizowanej probówki. Ponieważ toksyczność glikolu w dawce roztworu 1 molowego okazała się większa od oczekiwanej odstąpiono od założeń

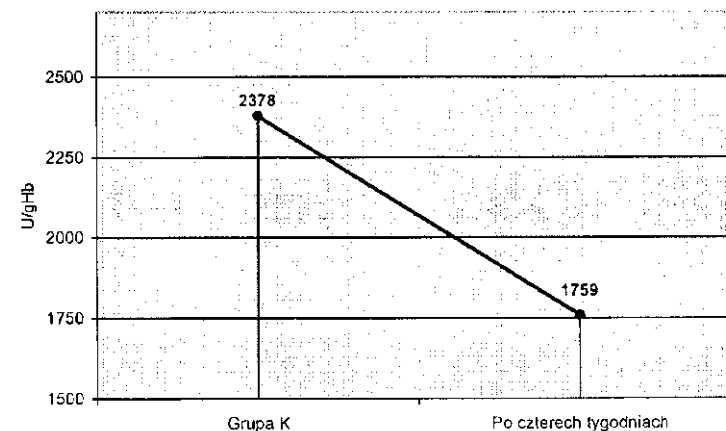
eksperymentu i uśmiercano zwierzęta po wystąpieniu znacznie nasilonych objawów choroby takich jak: spadek masy ciała o więcej niż 20% od wartości wyjściowej lub zaburzeń neurologicznych pod postacią drgawek. Wszystkie zwierzęta zostały uśmiercone w ciągu pierwszych 4 tygodni eksperymentu. Część zwierząt padła samoistnie i te zostały wykluczone z badań.

Do badań pobierano krew z serca i umieszczano ją w probówkach z antykoagulantem (EDTA). Po odwirowaniu i odciążeniu surowicy dwukrotnie płukano krwinki 0,9% NaCl, a następnie hemolizowano je za pomocą wody destylowanej. W uzyskanym materiale oznaczano aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (CuZn-SOD), którą oznaczano metodą Misry i Fridovicha oraz katalazy (EC 1.11.1.6.) metodą Beers'a i Sizera. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) oznaczono metodą Placera i wsp. (2,12, 17, 22).

Analizę statystyczną opracowano w oparciu o testy parametryczne (t-Studenta dla małych prób, przy poziomie istotności 0.05) przy użyciu programu STATISTICA.

WYNIKI

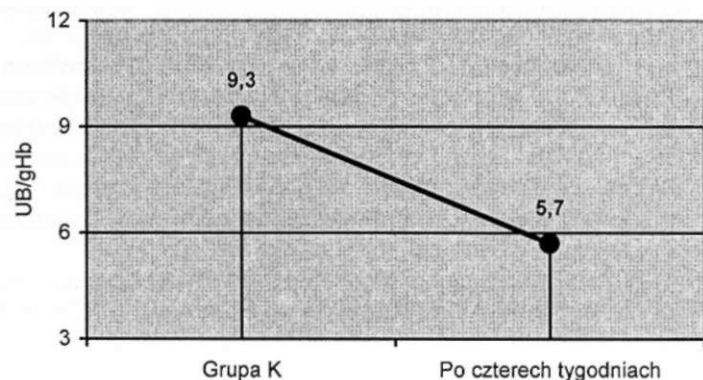
W grupie porównawczej - K aktywność dysmutazy wynosiła 2378 U/gHb, natomiast aktywność tego enzymu w erytrocytach szczurów, które były pojone przez cztery tygodnie glikolem etylenowym (grupa D) wyraźnie spadła i wynosiła 1759 U/gHb, a ujawnione różnice były statystycznie istotne ($p < 0.001$).



Ryc. 1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w czwartym tygodniu eksperymentu.
Fig. 1. Superoxide dismutase activity in the fourth week of the experiment.

	K	D
Liczba badanych (N ważnych)	5	21
min-max	2038,0-2889,0	1211,0-2206,0
Średnia	2378,4	1758,8
SD	325,07	276,25
Analiza statystyczna	t=4,37 p<0,001	df=24

Aktywność katalazy w grupie zwierząt nie spożywających glikolu wynosiła 9,3U/gHb. W populacji szczurów pojonych glikolem aktywność katalazy zmniejszyła się i wynosiła 5,7U/gHb, a wykazane różnice były statystycznie istotne ($p < 0,001$).

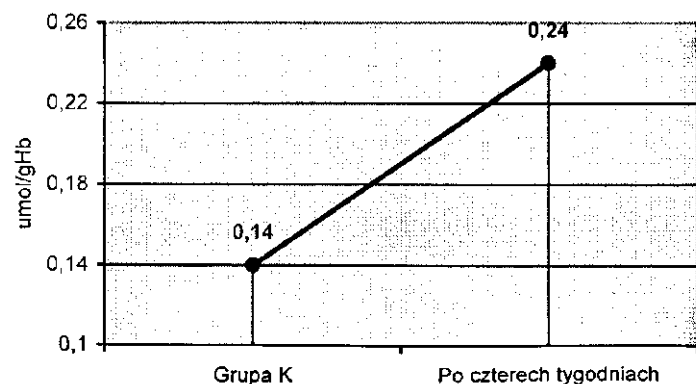


Ryc. 2. Aktywność katalazy w czwartym tygodniu eksperymentu.

Fig. 2. Catalase activity in the fourth week of experiment.

	K	D
Liczba badanych (N ważnych)	5	21
min-max	8,2-10,0	3,2-8,1
Średnia	9,26	5,75
SD	0,74	1,48
Analiza statystyczna	t=5,08 p<0,001	df=24

Przeprowadzone badania stężenia dialdehydu malonowego w krwinkach czerwonych szczurów spożywających glikol etylenowy wykazały, że uzyskane wartości były znacząco wyższe (0,24μmol/gHb) niż w grupie kontrolnej (0,14μmol/gHb) ujawnione różnice były statystycznie znamienne, $p < 0,001$.



Ryc. 3. Stężenie dialdehydu malonowego w czwartym tygodniu eksperymentu.

Fig. 3. Malonyl dialdehyde concentration in the fourth week of the experiment.

	K	D
Liczba badanych (N ważnych)	5	19
min-max	0,11-0,17	0,18-0,31
Średnia	0,14	0,24
SD	0,02	0,04
Analiza statystyczna	t=4,84 p<0,001	df=22

DYSKUSJA

W czasie przemian metabolicznych, jakim ulega glikol etylenowy, dochodzi do jego utleniania przez dehydrogenazę alkoholową do aldehydu glikolowego (8, 14, 15, 18). Publikacje ostatnich dziesięciu lat wykazały, iż glikol etylenowy może być także utleniony do formaldehydu (14, 15). W przebiegu obu tych reakcji następuje uwolnienie nadtlenu wodoru, który posiada silny potencjał uszkodzający (11, 6). Piśmiennictwo wskazuje, że anion ponadtlenkowy, powstający w czasie zwiększonego napływu GE do komórek, może być odpowiedzialny za niektóre jego toksyczne działania poprzez wystąpienia tzw. stresu oksydacyjnego (11). Uwolnienie wolnych rodników może więc odgrywać istotną rolę w patogenezie zmian wywołanych przez ten alkohol. Otrzymane wyniki: obniżenie aktywności dysmutazy i katalazy, a także wyraźny wzrost peroksydacji lipidów świadczą o istotnej ingerencji GE w obronę antyoksydacyjną komórek.

WNIOSKI

1. Czterotygodniowa intoksykacja glikolem etylenowym powoduje obniżenie aktywności dysmutazy i katalazy w krwinkach czerwonych u szczurów.
2. Glikol etylenowy spowodował wzrost poziomów stężeń produktów TBA reaktywnych (dialdehydu malonowego) w erytrocytach, co może przemawiać za stałą, nasiloną produkcją wolnych rodników w tkankach pod wpływem intoksykacji glikolem.

PIŚMIENNICTWO.

1. Asaluk I. K., Stanisławski O. K.: O prognozowaniu stopni ciężkości ostrego zatrucia etylenglikolem. Wracz. Dielo. 1989, 71, 103. - 2. Beers R., Sizer T.: Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 1952, 195, 133-140. - 3. Bielnik K., Młockowski D., Szram S.: Zmiany strukturalne w mięśniu sercowym szczurów narażonych na długotrwałe spożywanie glikolu etylenowego w niskich dawkach. Arch. Med. Sąd. Krym. 2000, L, 331-342. - 4. Bielnik K., Szram S.: Ultrastrukturalne oznaki

uszkodzenia mięśnia sercowego wywołane ostrym doświadczalnym zatruciem glikolem etylenowym. *Patol. Pol.* 1992, 43, 157-159. - 5. Bogdaliak T.: Postępy w leczeniu ostrych zatruc. *Post. Nauk. Med.* 1993, 6, 117-121. - 6. Buczyński A., Wachowicz B., Kędziora-Kornatowska K., Tkaczewski W., Kędziora J.: Changes in antioxidant enzymes activities, aggregability and malondialdehyde concentration in blood platelets from patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 100 (1993), 223-228. - 7. Chmielewska J., Myśliwiec M.: Ostre zatrucie glikolem etylenowym leczone hemodializą. *Wiad. Lek.* 1993, 32, 440-445. - 8. Clay K. L., Murphy R. C.: On the metabolic of ethylene glycol intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1977, 39. - 9. Gałęcki P., Jurczyk A., Kędziora J., Fijałkowski P., Błaszczak J., Jankowska B., Meissner E., Szram S., Śmigielski J.: Wpływ etanolu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i peroksydację lipidów w erytrocytach. *Przegląd Wojskowo-Medyczny*, 2001, 4. - 10. Hasiec T., Tymecka M.: Ostre zatrucie glikolem etylenowym o przebiegu przypominającym rozwój krwaka przymózgowego. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1991, 25, 501-503.

11. Kędziora J., Bartosz G.: Down's syndrom: A pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radical. Biol. Med.* 1988, 4, 317-330. - 12. 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. - 13. 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, 1, 18-23. - 14. Olszowy Z.: Badania doświadczalne nad przebiegiem zatrucia glikolem etylenowym w aspekcie toksykologicznym i medyczno-sądowym. Cz.1. Kształtowanie się stężeń glikolu etylenowego i jego metabolitów w doświadczalnym zatruciu ostrym i podostrym. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2000, L, 1-13. - 15. Olszowy Z.: Badania doświadczalne nad przebiegiem zatrucia glikolem etylenowym w aspekcie toksykologicznym i medyczno-sądowym. Cz.2. Wybrane parametry biochemiczne w doświadczalnym zatruciu glikolem etylenowym. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2000, L, 89-101. - 16. Olszowy Z.: Badania doświadczalne nad przebiegiem zatrucia glikolem etylenowym w aspekcie toksykologicznym i medyczno-sądowym. Cz.3. Badania mikroskopowe w ostrym i podostrym zatruciu glikolem etylenowym. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2000, L, 331-342. - 17. Placer Z., Cushman L., Johnson B.: Estimation of product of lipid peroxidation malondialdehyde in biochemical systems. *Anal. Bioch.* 1966, 16, 359-364. - 18. Puka J., Szajewski J.: Zatrucie glikolem etylenowym - 205 przypadków leczonych w stołecznym ośrodku ostrych zatruc. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1988, 2-3(8-9), 88-98. - 19. Rygol K. A.: Ocena śmiertelnych zatruc glikolem etylenowym w aspekcie medyczno-sądowym i społecznym. *Zeszyty Naukowe.* 1999, 7, 5-31. - 20. Szram S., Bielnik K., Trojanowski K., Młockowski D., Wołkanin P.: Analiza morfologiczna mikroskopowo-światlna i elektronowa zmian w wątrobie w przewlekłej intoksykacji glikolem etylenowym. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2000, L, 15-27.

21. Szram S., Trojanowski K., Zieliński K., Bielnik K., Młockowski D., Koktysz R., Wołkanin P., Stępień M.: Ocena morfometryczna i ultrastrukturalna zmienności jąder hepatocytów w przebiegu przewlekłej doświadczalnej

intoksykacji glikolem etylenowym. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1999, XLIX, 179-190. - 22. Young I. S., Trimble E. R.: Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann. Clin. Biochem.* 1991, 28, 504-508.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM
ul. Sędziowska 18a
91-304 Łódź