

Anna Łukaszewicz-Hussain

STĘŻENIE GLUTATIONU W WĄTROBIE I W SUROWICY KRWI ORAZ NADTLENKU WODORU W WĄTROBIE SZCZURÓW W PODOSTRYM ZATRUCIU CHLORFENWINFOSEM — INSEKTYCYDEM FOSFOROORGANICZNYM

LIVER AND SERUM GLUTATHIONE CONCENTRATION AND LIVER HYDROGEN PEROXIDE IN RATS SUBCHRONICALLY INTOXICATED WITH CHLORFENVINPHOS — ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDE

Uniwersytet Medyczny, Białystok
Zakład Toksykologii

STRESZCZENIE

Wstęp: Podstawowym mechanizmem toksycznego działania insektycydów fosforoorganicznych jest hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy (AChE). Insektycydy te, zarówno w ostrych, podostrych, jak i przewlekłych zatruciach mogą jednak prowadzić także do stresu oksydacyjnego, powodując wzrost peroksydacji lipidów oraz zmianę aktywności enzymów antyoksydacyjnych i stężenia nieenzymatycznych antyoksydantów. Celem niniejszej pracy było oznaczenie stężenia glutationu w wątrobie i w surowicy krwi oraz stężenia nadtlenu wodoru w wątrobie w podostrym zatruciu chlorfenwinfossem u szczurów. **Materiały i metody:** Badania wykonano na szczurach samcach szczepu Wistar, którym sondą dożołądkowo podawano raz dziennie chlorfenwinfos w dawce 0,3 mg/kg/dzień przez 14 lub 28 dni. Oznaczenia biochemiczne (glutation zredukowany i nadtlenek wodoru) wykonywano za pomocą gotowych zestawów BIOXYTECH GSH-400™ oraz H₂O₂-560™ Assay kit (firmy Oxis, International, Inc., Portland, USA) oraz Glutathione Assay Kit (Cayman Chemical Company, USA) (oznaczanie glutationu całkowitego w surowicy). **Wyniki:** W podostrym zatruciu chlorfenwinfossem stwierdzono istotne statystycznie obniżenie stężenia glutationu zredukowanego w wątrobie, któremu towarzyszył wzrost stężenia nadtlenu wodoru w tym narządzie oraz wzrost stężenia glutationu całkowitego w surowicy. Obserwowane zmiany nasilały się wraz wydłużeniem okresu podawania insektycydu z 14 do 28 dni. **Wnioski:** Insektycydy fosforoorganiczne występują powszechnie jako zanieczyszczenie środowiska, dlatego poprzez zmniejszenie stężenia glutationu zredukowanego w wątrobie mogą stanowić dodatkowy czynnik ryzyka u osób leczonych np. paracetamolem czy u osób nadużywających alkoholu. Med. Pr. 2011;62(1):23–29

Słowa kluczowe: chlorfenwinfos, zredukowany glutation, całkowity glutation, nadtlenek wodoru

ABSTRACT

Background: Toxicity of organophosphate insecticides is mainly due to the inhibition of acetylcholinesterase (AChE). However organophosphate insecticides in acute as well as in chronic and subchronic intoxication may lead to oxidative stress causing enhancement of lipid peroxidation and changing the activities of antioxidative enzymes and concentration of non-enzymatic antioxidant. For this reason the aim of the work was to estimate glutathione and hydrogen peroxide levels in the liver, as well as the concentration of total glutathione in serum of rats in subchronic intoxication with chlorfenvinphos. **Materials and Methods:** The animals received chlorfenvinphos, intragastrically with use of a stomach tube, at a one daily dose of 0.3 mg/kg/day for 14 or 28 days. For biochemical determinations BIOXYTECH GSH-400™ and BIOXYTECH H₂O₂-560™ Assay kit, OXIS International, Inc., Portland, USA (reduced glutathione and hydrogen peroxide), and Glutathione Assay Kit, Cayman Chemical Company, USA (determination of serum total glutathione level) were used. **Results:** Chlorfenvinphos administration resulted in a decreased level of reduced glutathione in liver accompanied by an increase in liver hydrogen peroxide and serum total glutathione concentrations. The observed changes were more pronounced after 28 days of intoxication. **Conclusions:** The common use of organophosphate insecticides results in the environmental pollution, therefore, the decreased liver glutathione level is an additional risk factor for people treated with different medicine (e.g. paracetamol). Med Pr 2011;62(1):23–29

Key words: chlorfenvinphos, reduced glutathione, total glutathione, hydrogen peroxide

Adres autorki: Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul Mickiewicza 2c, 15-222 Białystok, e-mail: anhussa@wp.pl

Nadesłano: 15 czerwca 2010

Zatwierdzono: 15 grudnia 2010

WSTĘP

Podstawowym mechanizmem toksycznego działania insektycydów fosforoorganicznych (organophosphate insecticides — OP) jest hamowanie aktywności acety-

locholinoesterazy (acetylcholinesterase — AChE) (1,2). Objawy kliniczne ostrego zatrucia tymi insektycydami wynikają zatem z zahamowania aktywności tego enzymu — kumulacji acetylocholino i aktywacji receptorów

muskarynowych oraz nikotynowych (1,3,4). Insektycydy fosforoorganiczne, zarówno w ostrych, jak i przewlekłych zatruciach, mogą jednak prowadzić także do stresu oksydacyjnego, powodując wzrost peroksydacji lipidów oraz zmianę aktywności enzymów antyoksydacyjnych i stężenia nieenzymatycznych antyoksydantów (1,4–6). W badaniach Vidyasagar i wsp. (5) wykazano np. wzrost stężenia dialdehydu malonowego (malonyldialdehydu — MDA) w surowicy i aktywności dysmutazy nadadtlenkowej (superoxide dismutase — SOD) w erytrocytach u osób hospitalizowanych z powodu ostrego zatrucia OP. U osób tych nie obserwowano normalizacji badanych parametrów po podaniu atropiny i pochodnych oksymów.

Ryzyko wynikające ze stosowania pestycydów dotyczy przede wszystkim osób zatrudnionych przy dystrybucji i produkcji tych związków, pracowników rolnych, ale także osób mieszkających na terenach rolniczych lub spożywających skażoną nimi żywność. Niewielki odsetek populacji jest zagrożony przyjęciem wystarczająco dużej dawki pestycydu, aby wystąpiły objawy ostrego zatrucia. Duża jest natomiast liczba osób, które w sposób przewlekły narażone są na niewielkie ilości tych związków, przez co mogą być one zagrożone wystąpieniem takich skutków zdrowotnych, jak np. nowotwory czy zaburzenia immunologiczne, czy pojawieniem się zaburzenia bariery antyoksydacyjnej organizmu (1,2,7,8).

Glutation (γ -glutamylcysteinylglycyna) jest rozpuszczalnym w wodzie tripeptydem zawierającym cysteinę i pełniącym bardzo ważną funkcję jako jeden z najważniejszych antyoksydantów nieenzymatycznych. Występuje on w tkankach wszystkich ssaków. Może występować w formie zredukowanej (reduced glutathione — GSH) i utlenionej (glutathione disulfide — GSSG). Prawie 90% GSH występuje w cytozolu komórki, około 10% w mitochondriach i niewielki procent w retikulum endoplazmatycznym (1,9,10). W komórkach glutation występuje przede wszystkim w formie zredukowanej. Stosunek GSH do GSSG w cytozolu i w mitochondriach wynosi 10:1, a półokres trwania GSH w cytozolu wątroby szczura — 2–3 godziny (9,10).

Oprócz wspomnianej już funkcji antyoksydacyjnej glutation bierze też udział w detoksykacji ksenobiotyków, jest magazynem cysteiny w organizmie oraz utrzymuje grupy –SH białek w stanie zredukowanym (9). Najwyższe stężenia osiąga w wątrobie i nerkach (9–11). Glutation występuje też w osoczu krwi, żółci, limfie i moczu (9,10).

Związek ten pełni także ważną, ochronną rolę, zapobiegając toksycznemu działaniu wielu ksenobiotyków lub je zmniejszając poprzez wiązanie się z sub-

stancją wnikałą do organizmu lub jej metabolitem, co w następstwie może powodować zmiany stężenia glutationu w tkankach organizmu (9–11). Dotyczy to zarówno substancji występujących jako zanieczyszczenia środowiska, w tym insektycydów fosforoorganicznych, jak i stosowanych jako używki lub leki (7,13,14).

Z kolei nadtlenek wodoru powstaje w wyniku reakcji dysmutacji anionorodnika nadadtlenkowego lub podczas dwuelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego, a w obecności jonów metali przejściowych (reakcja Fentona) ulega rozpadowi z wytworzeniem bardzo niebezpiecznego rodnika hydroksylowego. Nadtlenek wodoru, który należy do reaktywnych form tlenu, z łatwością dyfunduje przez błony komórkowe. Dzięki temu może przemieszczać się do komórek bardzo odległych od miejsca swego powstania, a jego stężenie w warunkach stresu oksydacyjnego może wzrastać (15).

Celem niniejszej pracy było oznaczanie stężenia glutationu zarówno w wątrobie, jak i surowicy krwi, oraz stężenia nadadtlenku wodoru w wątrobie w podostrym zatruciu chlorfenwinfossem u szczurów.

MATERIAŁY I METODY

Badania wykonano na szczurach samcach szczepu Wistar (stado CRL: (WI)WUBR), o masie ciała 180–200 g, pochodzące z Hodowli Zwierząt Doświadczalnych w Brwinowie koło Warszawy. Zwierzęta karmione były granulowaną paszą standardową i pojone wodą *ad libitum*. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku.

Zwierzętom doświadczalnym przez 14 lub 28 dni raz dziennie podawano sondą dożołądkową roztwór olejowy chlorfenwinfosu (O,O-dietylfosforan 1-(2,4-dichlorofenylo)-2-chlorowinylo) w dawce 0,3 mg/kg/dzień. Zwierzęta grupy kontrolnej w analogiczny sposób otrzymywały olej.

Materiał do badań biochemicznych (skrawki wątroby i krew z serca) pobierano 24 godziny po podaniu ostatniej dawki badanego związku fosforoorganicznego lub w przypadku grup kontrolnych — oleju. Każda grupa liczyła 6 szczurów. Zwierzęta usypiano przy użyciu Vetbutalu.

Stężenie glutationu zredukowanego oznaczano przy użyciu gotowych zestawów BIOXYTECH GSH-400™ Assay kit produkcji OXIS International, Inc., Portland, USA. Przed oznaczaniem tkanki homogenizowano w roztworze kwasu metafosforowego przy użyciu homogenizatora teflonowego i wirowano 3000×g przez 10 min.

W tak uzyskanym nadsączu oznaczenia biochemiczne wykonywano zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu. Absorbancję odczytywano przy długości fali 400 nm. Stężenie GSH w wątrobie odczytywano z krzywej standardowej sporządzonej z GSH (zgodnie z instrukcją zamieszczoną w zestawie) i wyrażano w mmol/g tkanki.

Krew celem uzyskania surowicy wirowano 1000×g przez 10 min. Surowicę odbiałczano przy użyciu 5-procentowego roztworu kwasu metafosforowego i wirowano 5 min przy obrotach 2000×g. Oznaczanie stężenia glutationu w surowicy prowadzono przy użyciu zestawu Glutathione Assay Kit, Cayman Chemical Company, USA.

Oznaczenia stężenia glutationu całkowitego, czyli sumę GSH i GSSG, w odbiałczonej surowicy prowadzono zgodnie z instrukcją zamieszczoną w zestawie. W oznaczaniu stężenia glutationu wykorzystano reakcję między grupami sulfhydryłowymi glutationu a DTNB (kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy), w wyniku której powstaje mający żółte zabarwienie kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy, którego ilość jest proporcjonalna do stężenia glutationu w badanej próbce. Absorbancję mierzono przy użyciu uniwersalnego czytnika mikroplątek przy długości fali: 405 nm. W zestawie wykorzystywana jest reduktaza glutationowa, dlatego zestaw umożliwia jedynie oznaczenie stężenia glutationu całkowitego.

Stężenia glutationu w próbach odczytywano z krzywej standardowej, sporządzonej zgodnie z instrukcją zawartą w zestawie, i wyrażano w mmol/dm³ surowicy.

Skrawki wątroby, w których oznaczano stężenie nadtlenu wodoru i białka, homogenizowano w buforze fosforanowym. Uzyskiwane 10-procentowe homogenaty wirowano 9000×g przez 15 min. Oznaczenia biochemiczne prowadzono w rozcieńczonym płynie nadosadowym.

Stężenie nadtlenu wodoru w homogenacie wątroby oznaczano metodą kolorymetryczną, przy użyciu zestawu BIOXYTECH H₂O₂ 560™ Assay kit (Oxis, USA). Metoda oparta jest na przejściu jonu żelazowego (Fe²⁺) w jon żelazowy (Fe³⁺) w warunkach kwasowych. Jon żelazowy wiąże związek wskaźnikowy, którym w tej metodzie jest oranż ksylenowy, czyli sól sodowa 3,3'-bis(N,Ndi(karboksymetylo)-aminometylo)-o-krezolosiarkoftalenu, i tworzy się stabilny, barwny kompleks. Ekstynkcję mierzono przy długości fali 560 nm. Stężenie nadtlenu wodoru odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej z 25 mM roztworu H₂O₂.

Stężenie nadtlenu wodoru w homogenacie wątroby wyrażano w mikromolach nadtlenu wodoru na miligram białka (μmol/mg białka), które oznaczano metodą według Lowry'ego i wsp. (16), używając albuminy wołowej jako standardu.

W grupie kontrolnej oraz w grupach badanych obliczono średnie, odchylenia standardowe oraz wariancje. Wyniki uzyskane w poszczególnych grupach badanych odnoszono do grupy kontrolnej, badano też zależności występujące między nimi za pomocą testu t-Studenta, przyjmując za różnice istotne statystycznie wartości różniące się przy p < 0,05. Obliczenia statystyczne wykonano, posługując się programem komputerowym Statistica 6.0.

WYNIKI

W wątrobie stwierdzono obniżenie stężenia glutationu zredukowanego istotnie statystycznie w stosunku do odpowiednich grup kontrolnych, zarówno po 14-dniowym, jak i 28-dniowym podawaniu chlorfenwinfosu (tab. 1). Zaobserwowano również, że wydłużenie okresu podawania insektycydu fosforoorganicznego

Tabela 1. Stężenie glutationu zredukowanego w wątrobie i glutationu całkowitego w surowicy krwi szczurów oraz nadtlenu wodoru w wątrobie w podostym zatruciu chlorfenwinfossem (CVP)

Table 1. Levels of liver reduced glutathione, serum total glutathione and liver hydrogen peroxide in subchronic intoxication with chlorfenwinphos (CVP)

Okres podawania CVP Duration of CVP intoxication	Dawka Dose	Stężenie GSH w wątrobie [mmol/g tkanki] Liver GSH level [mmol/g tissue]	Stężenie glutationu całkowitego w surowicy* Serum total glutathione level* [mmol/dm ³]	Stężenie H ₂ O ₂ w wątrobie* [μmol/mg białka] Liver H ₂ O ₂ level* [μmol/mg protein]
14 dni / days	0	22,22±2,09	4,44±0,39	2,78±0,28
	0,3 mg/kg	17,57±2,31 ^a	6,25±0,48 ^{ab}	3,88±0,15 ^a
28 dni /days	0	23,08±1,50	4,51±0,43	2,73±0,24
	0,3 mg/kg	12,68±2,29 ^{ab}	8,65±0,91 ^{ab}	5,59±0,82 ^{ab}

* Średnie ± odchylenie standardowe / Means ±SD.

^a Wartości istotne statystycznie w stosunku do kontroli / Significantly different from control.

^b Wartości istotne statystycznie w stosunku do grupy otrzymującej CVP przez okres 14 dni / Significantly different from group of rats receiving CVP for 14 days.

z 14 do 28 dni prowadzi do dalszego, istotnego statystycznie obniżenia jego stężenia w wątrobie.

Stężenie glutationu zredukowanego w stosunku do odpowiedniej grupy kontrolnej obniżało się o 20% po 14 dniach podawania chlorfenwinfosu i o około 50% po 28 dniach. W surowicy krwi zwierząt doświadczalnych oznaczano stężenie całkowite glutationu. Stwierdzono istotny statystycznie wzrost tego stężenia, zarówno po 14, jak i 28 dniach podawania badanego insektycydu (tab. 1). Wzrost ten wynosił odpowiednio około 42% i 82%, czyli wydłużenie okresu podawania chlorfenwinfosu powodowało dalszy wzrost stężenia glutationu całkowitego w surowicy.

Stężenie nadtlenku wodoru w wątrobie wzrosło istotnie statystycznie w stosunku do wartości obserwowanych w odpowiednich grupach kontrolnych zarówno po 14, jak i 28 dniach podawania chlorfenwinfosu (tab. 1). Po 14 dniach podawania insektycydu wzrost ten wynosił około 40%, a w przypadku dłuższego podawania stężenie nadtlenku wodoru było ponad dwukrotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W podostrym zatruciu chlorfenwinfossem u szczurów stwierdzono obniżenie stężenia glutationu zredukowanego w wątrobie, zarówno po 14 dniach podawania insektycydu, jak i 28, przy czym stężenie GSH malało wraz z czasem podawania insektycydu. Obniżeniu stężenia glutationu zredukowanego w wątrobie towarzyszył wzrost stężenia glutationu całkowitego w surowicy. Zmiany stężenia glutationu w niniejszej pracy obserwowano po podaniu chlorfenwinfosu w dawce 0,3 mg/kg/dzień. Dopuszczalne dzienne pobranie dla ludzi wynosi 0,0005 mg/kg/dzień, a najniższy poziom narażenia, przy którym obserwuje się efekty szkodliwe, ustalony w oparciu o neurologiczne działanie tego insektycydu u szczurów, przyjmowany jest na poziomie 0,7 mg/kg/dzień (1,17). W niniejszej pracy zmiany stężenia glutationu w wątrobie i w surowicy krwi oraz zmiany stężenia nadtlenku wodoru w wątrobie obserwowane były więc przy dawce niższej niż LOAEL dla szczurów.

We wcześniejszych badaniach, prowadzonych przy zastosowaniu tego samego modelu doświadczalnego, obserwowano obniżenie aktywności ChE w surowicy, istotne statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, dopiero po 28 dniach podawaniu chlorfenwinfosu (1). Enzym ten jest wykorzystywany do oceny narażenia na insektycydy fosforoorganiczne u ludzi mających zawodowy kontakt z tymi związkami (1,8). Z kolei zmiany

aktywności enzymów antyoksydacyjnych w wątrobie, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa, występowały już po 2 tygodniach podawania chlorfenwinfosu. Aktywność dwóch ostatnich wymienionych enzymów po 28 dniach podawania insektycydu była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do krótszego okresu intoksykacji. Wzrostowi aktywności enzymów antyoksydacyjnych towarzyszył także wzrost stężenia dialdehydu malonowego — wskaźnika peroksydacji lipidów (1).

Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych w zatruciu podostrym różnymi związkami fosforoorganicznymi obserwowali też inni autorzy (7,18,19).

Obserwowane we wcześniejszych badaniach zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych i wzrost peroksydacji lipidów (1), a także stwierdzone w niniejszej pracy wzrost stężenia nadtlenku wodoru oraz zmiany stężenia glutationu świadczą o stresie oksydacyjnym, do którego dochodzi w wątrobach szczurów w podostrym zatruciu chlorfenwinfossem.

Powstawanie reaktywnych form tlenu w zatruciu insektycydami fosforoorganicznymi może wynikać z metabolizmu tych związków w wątrobie, w którym uczestniczy frakcja mikrosomalna związana z cytochromem P450, odpowiedzialna za metabolizm także wielu innych ksenobiotyków (20–22). Zredukowana forma cytochromu P450 wiąże tlen i przeprowadza hydroksylację substratu (w tym przypadku insektycydu fosforoorganicznego), czyli wbudowuje do cząsteczki substratu atom tlenu, dzięki czemu w cząsteczce substratu powstaje grupa hydroksylowa — OH. Podczas przepływu elektronów przez mikrosomalny łańcuch transportu elektronów wytwarzane są anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru (20,21).

Dodatkowym czynnikiem, który może powodować wzrost stężenia nadtlenku wodoru w wątrobie, co obserwowano w niniejszej pracy, jest SOD. Enzym ten usuwa anionorodnik ponadtlenkowy, jednocześnie prowadząc do tworzenia nadtlenku wodoru (23).

W niniejszej pracy obserwowano wzrost stężenia nadtlenku wodoru w wątrobie w całym badanym okresie, przy czym stężenie to rosło wraz z wydłużeniem okresu podawania insektycydu. W zatruciach insektycydami fosforoorganicznymi rzadko oznacza się stężenia reaktywnych form tlenu (RFT). Badane są przede wszystkim zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych i skutki wzmożonego generowania RFT w postaci wzrostu peroksydacji lipidów czy też wzmożonego powstawania grup karbonylowych — wskaźnika utleniania białek (1,18,24).

W naszych wcześniejszych badaniach, dotyczących ostrego zatrucia chlorfenwinfosomem u szczurów, obserwowano wzrost stężenia H_2O_2 zarówno w wątrobie, jak i w surowicy krwi. Badania te wykazały wzrost stężenia nadtlenu wodoru w wątrobie i w surowicy, w 1. i 24. godzinie po podaniu tego związku w dawkach 0,3 mg/kg i 1,5 mg/kg oraz w 1., 24. i 48. godzinie po podaniu CVP w najwyższej badanej dawce, czyli 7,5 mg/kg (25).

W zatruciu ostrym chlorfenwinfosomem oceniano także aktywność mitochondrialnej akonitazy, której aktywność ulegała obniżeniu pod wpływem badanego insektycydu (26). Enzym ten jest hamowany przez anionorodnik ponadtlenkowy i jego aktywność może być wskaźnikiem zwiększonej generacji tej reaktywnej formy tlenu (26). Jak więc wynika z cytowanej powyżej pracy, w zatruciu ostrym chlorfenwinfosomem dochodzi do wzrostu stężenia anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach wątroby szczura, a towarzyszy temu zarówno wzrost stężenia nadtlenu wodoru, jak i dialdehydu malonowego (26).

Enzymami odpowiedzialnymi za usuwanie nadtlenu wodoru jest katalaza i peroksydaza glutationowa. Peroksydaza glutationowa w procesie usuwania nadtlenu wodoru zużywa zredukowany glutation, w wyniku czego powstaje jego utleniona forma. Stres oksydacyjny może prowadzić zatem do zmniejszenia puli GSH w komórce i wzrostu poziomu GSSG (1,9,12). Forma utleniona glutationu może reagować z grupami tiolowymi białek, wskutek czego powstają mieszane disulfidy wykazujące działanie toksyczne, może też utleniać grupy tiolowe białek, co prowadzi do ich inaktywacji (2,9,10). Tak więc GSSG musi być transportowany przez błonę komórkową celem utrzymania jego niskiego stężenia wewnątrzkomórkowego, a wzrost stężenia utlenionej formy może być wskaźnikiem stresu oksydacyjnego (27).

W niniejszej pracy obserwowano obniżenie stężenia GSH w wątrobie przy jednoczesnym wzroście stężenia glutationu całkowitego w surowicy. Zmianom stężenia glutationu towarzyszył także wzrost stężenia nadtlenu wodoru w wątrobie.

Obserwowany w niniejszej pracy wzrost poziomu glutationu całkowitego w surowicy krwi może wynikać zarówno ze wzrostu stężenia glutationu zredukowanego, jak i glutationu utlenionego, ale może być też spowodowany podwyższeniem stężenia obu tych frakcji jednocześnie. Na całkowitą zawartość glutationu w organizmie składają się bowiem, jak już wspomniano wyżej, dwie jego frakcje — zredukowana, stanowiąca ponad 98% jego całkowitego stężenia, oraz utleniona (9–11). Jak

już pisano wcześniej, zmniejszenie stężenia GSH w wątrobie może wynikać z jego wykorzystania przez peroksydazę glutationową, w związku z czym przechodzi on w formę utlenioną (1,9,12). Ponieważ w niniejszej pracy obserwowano jednocześnie obniżenie stężenia glutationu zredukowanego w wątrobie i wzrost stężenia glutationu całkowitego w surowicy, można przypuszczać, że głównym powodem tego wzrostu jest usuwanie nadmiaru GSSG z wątroby. Może to świadczyć o osłabieniu zdolności organizmu do inaktywacji RFT, co w konsekwencji prowadzi do obserwowanego w niniejszych badaniach zwiększenia stężenia nadtlenu wodoru w wątrobie, a także opisywanego we wcześniej cytowanej pracy — wzrostu stężenia dialdehydu malonowego w wątrobie (1).

Zaobserwowane w niniejszej pracy obniżenie stężenia glutationu zredukowanego i wzrost stężenia nadtlenu wodoru w wątrobie w podostrym zatruciu niewielką dawką chlorfenwinfosu może być niebezpieczne przy narażeniu na inne ksenobiotyki stosowane jako leki czy używki (28–31).

Glutation uczestniczy nie tylko w reakcjach wolnorodnikowych. Bierze on także udział w reakcjach sprzęgania wielu ksenobiotyków. Reakcjom sprzęgania z GSH ulegają np. metabolity acetaminofenu (paracetamol) — powszechnie stosowanego leku. W wyniku działania cytochromu P450 lek ten jest utleniany w wątrobie do silnie elektrofilowych produktów pośrednich, których detoksykacja przebiega poprzez tworzenie połączeń z glutationem zredukowanym. Przy braku odpowiedniego poziomu glutationu w wątrobie produkty pośrednie metabolizmu acetaminofenu tworzą addukty z białkami błonowymi, odpowiedzialnymi za homeostazę wapnia w komórce. Prowadzi to do uszkodzenia komórki wątrobowej i powoduje dalsze obniżenie stężenia GSH w tym narządzie (28,29). Odpowiednio wysoki poziom GSH w wątrobie chroni ją więc przed toksycznym działaniem metabolitów acetaminofenu. Dawki terapeutyczne są całkowicie bezpieczne, natomiast nadużywanie tego leku (szczególnie przez osoby o obniżonym poziomie glutationu w wątrobie) niesie za sobą ryzyko jej uszkodzenia.

Ze względu na niski poziom GSH, jak wynika z badań innych autorów, wzrasta także ryzyko nekrozy wątroby u alkoholików zażywających acetaminofen (13,30). Alkohol etylowy bowiem prowadzi do wzrostu tworzenia się reaktywnych form tlenu i obniżenia poziomu glutationu w mitochondriach wątroby, a w konsekwencji u osób nadużywających alkoholu często dochodzi do uszkodzenia tego narządu (14,31).

Przykładem może być także Kaptopril — lek szeroko stosowany w leczeniu nadciśnienia tętniczego — który jak wynika z badań na zwierzętach również zmniejsza stężenie GSH w wątrobie, a także zwiększa ryzyko uszkodzenia wątroby przy równoczesnym leczeniu paracetamolem (32).

Tak więc obserwowane w niniejszej pracy obniżenie stężenia glutationu w wątrobie — z jednoczesnym wzrostem stężenia nadtlenu wodoru i wzrostem stężenia glutationu całkowitego w surowicy krwi — świadczy o stresie oksydacyjnym w tym narządzie, którego przyczyną jest narażenie na chlorfenwinfos.

Insektycydy fosforoorganiczne występują powszechnie jako zanieczyszczenie środowiska, dlatego poprzez swoje działanie na glutation zredukowany mogą stanowić dodatkowy czynnik ryzyka u osób leczonych np. paracetamolem czy też u osób nadużywających alkoholu. Szczególną uwagę należałoby więc zwrócić na osoby mające bezpośredni, zawodowy, kontakt ze związkami fosforoorganicznymi i jednocześnie przyjmującymi leki.

PIŚMIENNICTWO

1. Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J., Roszczenko A.: Effects of subchronic chlorfenvinphos administration on liver antioxidative parameters and lipid peroxidation marker in experimental rats. *Toxicol. Environ. Chem.* 2008;90(1):7–13
2. Costa L.G.: Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta* 2006;306:1–13
3. Sharma Y., Bashir S., Irshad M., Gupta S.D., Dogra T.D.: Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicology* 2005;206:49–54
4. Savolainen K.: Understanding the toxic action of organophosphates. *Handbook of pesticide toxicology*. Wyd. 2. Academic Press, San Diego (USA) 2001, ss. 1013–1043
5. Vidyasagar J., Karunaker N., Reddy M.S., Rajnarayana K., Surender T., Krishna D.R.: Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorus insecticide poisoning. *Indian J. Pharmacol.* 2004;36:76–79
6. Łukaszewicz-Hussain A.: Organophosphate insecticide chlorfenvinphos affects superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde in rat liver. *Pol. J. Environ. Stud.* 2001;10:279–281
7. Łukaszewicz-Hussain A.: Changes in antioxidative parameters in the kidney of rats subchronically intoxicated with chlorfenvinphos — an organophosphate insecticide. *Cent. Eur. J. Med.* 2009;4:506–511
8. Łukaszewicz-Hussain A.: Narażenie zawodowe i środowiskowe na insektycydy fosforoorganiczne, wskaźniki narażenia i skutki zdrowotne — przegląd piśmiennictwa. *Med. Pr.* 2007;58(4):345–351
9. Łukaszewicz-Hussain A.: Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu. *Med. Pr.* 2003;54(5):473–479
10. Lu S.C.: Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 1999;13:1169–1183
11. Łukaszewicz-Hussain A.: Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46:82–86
12. Gerard-Monier D., Chaudiere J.: Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol. Biol.* 1996;44: E209–E214
13. Bukowska B.: Funkcje glutationu oraz czynniki zmniejszające jego stężenie. *Med. Pr.* 2005;56:69–80
14. Adachii M., Ishii H.: Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;32:487–491
15. Rutkowski R., Pancewicz S.A., Rutkowska J.: Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2007;23: 131–136
16. Lowry O.H., Rosenbrough M.J., Farr A.L., Randall R.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265–275
17. US Department of Health and Human Services. Public Health Service: Toxicological profile for chlorfenvinphos. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta 1997
18. Akhgari M., Abdollahi M., Kebryazeezadeh A., Hosseini R., Sabzevari O.: Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003;22:205–208
19. Abdollahi M., Mostafalou S., Pournourmoohamadi S., Shadnia S.: Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol.* 2004;137:29–34
20. Bermhardt R.: Cytochrome P450: structure, function and generation of reactive oxygen species. *Rev. Biochem. Pharmacol.* 1995;127:137–221
21. De Groot H., Noll T.: Halothane hepatotoxicity: relation between metabolic activation, hypoxia, covalent binding, lipid peroxidation and liver damage. *Hepatology* 1983;3:601–606
22. Ikeda T., Kojima T., Yoshida M., Takahashi H., Tsuda S., Shirasu Y.: Pretreatment of rats with organophosphorus

- insecticide, chlorfenvinphos, protects against subsequent challenge with the same compound. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1990;14:560–567
23. Ho Y.S., Gargano M., Cao J., Bronson R.T., Wittman T., Fazekas T.: Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc dismutase. *J. Biol. Chem.* 1998;203:7765–7769
24. Shacter E.: Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.* 2000;319:428–436
25. Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J.: Liver catalase, glutathione peroxidase and reductase activity, reduced glutathione and hydrogen peroxide level in acute intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide. *Pol. J. Environ. Stud.* 2004;13(3):303–309
26. Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J.: Activity of mitochondrial aconitase and liver concentration of hydrogen peroxide in acute intoxication with chlorfenvinphos in rat. *Pol. J. Environ. Stud.* 2003;12:177–180
27. Currelo S., Ceconl C., Cargnonl A., Comacchiarl A., Ferrari R., Albertlri A.: Improved procedure for determining glutathione in plasma as an index of myocardial oxidative stress. *Clin. Chem.* 1987;33:1448–1449
28. Sturgill M.C., Lambert G.H.: Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanism of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin. Chim. Acta* 1997;43:1512–1526
29. Wang W., Ballatori N.: Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 1998;50:335–352
30. Lauterburg B.H., Velez M.E.: Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. *Gut* 1988;29:1153–1157
31. Wheeler M.D., Nakagami M., Bradford B.U., Uesugi T., Mason R.P., Connor H.D. i wsp.: Over expression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. *J. Biol. Chem.* 2001;276:36664–36672
32. Habior A.: Wpływ kaptoprilu na stężenie glutationu w wątrobie szczura i hepatotoksyczność paracetamolu u szczurów. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1992;87:332–340