

Beata Kaczmarek-Wdowiak
Ryszard Andrzejak
Anna Skoczyńska
Vladislaw Mlynek

WPŁYW PRZEWLEKŁEGO ZATRUCIA OŁOWIEM I KADMEM NA PEROKSYDACJĘ LIPIDÓW W MÓZGACH SZCZURÓW*

THE EFFECT OF CHRONIC EXPOSURE TO LEAD AND CADMIUM ON LIPID PEROXIDATION IN RAT'S BRAIN

Z Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego
Akademii Medycznej we Wrocławiu

STRESZCZENIE

Wstęp. Celem badań było określenie wpływu ekspozycji na ołów i kadm na stężenie niektórych lipidów, ich peroksydację, wydolność enzymatyczną i nieenzymatyczną antyutleniaczy w mózgu szczurów oraz złożonej ekspozycji na te metale na parametry lipidowe i aktywność układu antyoksydacyjnego i porównanie wyników w celu uchwycenia interakcji między tymi metalami w ich oddziaływaniu. **Materiał i metody.** Badanie przeprowadzono wykorzystując model przewlekłego subklinicznego zatrucia ołowiem i/lub kadmem na 66 szczurach szczepu Bufallo. **Wyniki.** Badania określiły stężenie ołowiu i kadmu we krwi szczurów i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz stężenia cholesterolu całkowitego, nadtlenków lipidów, witaminy C i E w tkankowych homogenatach. **Wnioski.** Pojedyncza i złożona ekspozycja na małe dawki ołowiu i kadmu wywołuje u szczurów zmiany parametrów świadczące o pobudzeniu peroksydacji lipidów i układu antyoksydacyjnego oraz interakcje w ich oddziaływaniu na peroksydację lipidów. Med. Pr. 2004; 55 (5): 403–410

SŁOWA KLUCZOWE: ołów, kadm, peroksydacja lipidów, homogenat, mózg, szczury

ABSTRACT

Background. The aim of the study was to evaluate the impact of exposure to lead and cadmium on concentrations of some lipids, lipid peroxidation, enzymatic and non-enzymatic efficiency of antioxidants in the rat brain as well as the effect of combined exposure to metals on the lipid parameters and the activity of antioxidative system. The authors also compared the results in order to detect interactions between these two heavy metals. **Materials and Methods.** The study used the model of chronic, sub-clinic intoxication of lead and/or cadmium in Bufallo rats. **Results.** The tests involved the determination of lead and cadmium concentrations in the rat blood, superoxide dismutase activity, total cholesterol, lipid peroxides, and levels of vitamins C and E in tissue homogenates. **Conclusions.** Single and combined exposures to small doses of lead and cadmium in rats results in the changed parameters showing the stimulation of lipid peroxidation and antioxidative system along with interactions in their influence. Med Pr 2004; 55 (5): 403–410

KEY WORDS: lead, cadmium, lipid peroxidation, brain, homogenate, rats

Adres autorów: Pasteura 4, 50-367 Wrocław, e-mail: wiwd@esculap.pl
Nadesłano: 4.02.2004
Zatwierdzono: 3.09.2004
© 2004, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

WSTĘP

Problemy środowiska, w którym żyjemy, mają wymiar globalny. Wciąż rośnie stopień ingerencji człowieka w świat przyrody, prowadzący do zagłady naturalnych ekosystemów. Zatruc różnymi ksenobiotykami, w tym metalami ciężkimi, nie można rozpatrywać pojedynczo, zwłaszcza przy próbie odpowiedzi na pytanie o charakter reakcji zachodzących w komórkach i bardziej złożonych strukturach organizmu ludzkiego, w środowisku, w którym zachodzi dana ekspozycja (1). Dodatkowo komplikuje sytuację fakt, że na skutki narażenia środowiskowego nakładają się skutki narażenia zawodowego, dlatego ważne są doświadczenia, w których bada się nie tylko jeden ksenobiotyk, ale rozpatruje złożoną ekspozycję, analizując jednocześnie odpowiedź w zakresie różnych układów i narządów.

Z licznych badań wiadomo, że dwa najbardziej rozpowszechnione metale ciężkie – ołów i kadm, odgrywające ogromną rolę w patogenezie chorób zawodowych, są problemem ludzi żyjących w zanieczyszczonych aglomeracjach i prawie zawsze oddziałują równolegle. Założono, że toksycz-

ne działanie ołowiu i kadmu obejmuje nasilenie peroksydacji lipidów w strukturach błonowych komórki różnych narządów organizmu. Nie do końca jednak znany jest mechanizm tego wpływu przy ekspozycji złożonej. Reakcje obronne uruchamiane w takiej sytuacji dotyczą nie tylko odpowiednich struktur, ale i mechanizmów metabolicznych, w tym enzymatyczne przy udziale na przykład dysmutazy ponadtlenkowej oraz nieenzymatyczne przy udziale między innymi antyutleniaczy, takich jak tokoferole czy kwas askorbinowy (2–7).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu ekspozycji na ołów, kadm oraz ołów i kadm (porównanie wyników w celu uchwycenia interakcji) na stężenie niektórych lipidów i ich peroksydację oraz wydolność enzymatyczną (SOD) i nieenzymatyczną (wit. C i E) antyutleniaczy w mózgu szczura.

MATERIAŁ I METODY

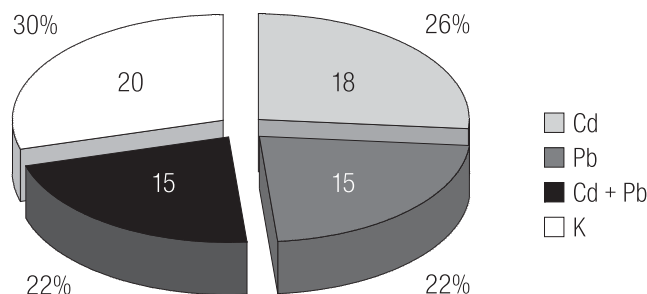
Badania przeprowadzono na 66 szczurach szczepu Bufallo, płci męskiej, w wieku 5–6 tygodni. Średnia masa ciała badanych szczurów wahała się od 195 do 245 g. Karmione były typową paszą granulowaną dla małych zwierząt laboratoryj-

* Praca wygłoszona na Symposium „Dolnośląskie Dni Medycyny Pracy”, Polanica Zdrój, 9–11 maja 2003 r.

nych typu LSM, z podażą wody w dowolnej ilości. Zwierzęta przez cały okres badań przebywały w zwierzętarni o stałej temperaturze 18–19°C i wilgotności 55%.

Przez 7 tygodni badanym szczurom podawano za pomocą sondy dożołądkowej ołów oraz kadm w postaci roztworów wodnych soli tych metali. Szczurom zatrutowanym ołowiem podawano octan ołowiu (CH_3COO) $\text{Pb}_3\text{H}_2\text{O}$ firmy Fluka w postaci 1,6% roztworu wodnego w dawce 35 mg/kg m.c. raz w tygodniu. Szczurom zatrutowanym kadmem podawano raz w tygodniu chlorek kadmu ($\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$) firmy Fluka w postaci 0,253% roztworu wodnego w dawce 5 mg/kg m.c. Szczurom, które zatrutowane były jednocześnie kadmem i ołowiem, podawano zarówno chlorek kadmu jak i octan ołowiu w dawkach opisanych powyżej. Grupa kontrolna otrzymywała 0,129% roztwór wodny octanu sodu (CH_3COO)Na i 0,129% roztwór NaCl w dawce 4ml/kg m.c. raz w tygodniu (ryc. 1).

W części doświadczalnej dokonano pomiarów stężenia ołowiu i kadmu we krwi. Ponadto w homogenatach mózgu zmierzono aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), stężenie cholesterolu całkowitego (CH), stężenie nadtlenków lipidów (LPO), stężenie witaminy C oraz stężenie witaminy E. Ołów i kadm we krwi pełnej oznaczono metodą bezpłomieniową w kuwecie grafitowej na spektrofotometrze absorpcji atomowej PU 9100 firmy Philips. Po pobraniu narządu od szczura homogenizację przeprowadzono homogenizatorem elektrycznym (8,9). Stężenie nadtlenków lipidów (LPO) w homogenatach oznaczono metodą kolorymetryczną z zastosowaniem kwasu tiobarbiturowego (9). Pomiarów stopnia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) dokonano za pomocą metody adrenalinowej (10). Pomiaru cholesterolu całkowitego dokonano testem enzymatycznym firmy RANDOX na spektrofotometrze firmy BECKMAN DU 650 po ekstrakcji odpowiednimi rozpuszczalnikami organicznymi. Oznaczenie poziomu witaminy E w homogenatach dokonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC, wykonywanej na aparacie firmy PHILIPS PYE UNICAM PU 4020 UV DETECTOR (elucję prowadzono na kolumnie Lichrosorb SI60) (11), natomiast witaminę C oznaczano za pomocą α , α' -dipirydyli (12).



K - grupa kontrolna.
K - control.

Ryc. 1. Struktura grup szczurów poddanych badaniom.
Fig. 1. Structure of the study groups of rats.

WYNIKI

Wyniki pomiarów wszystkich badanych wielkości (Pb, Cd we krwi oraz LPO, SOD, CH, wit. E, wit. C w homogenatach) poddano analizie statystycznej, do której wykorzystano pakiet statystyczny STATISTICA 5,0.

Dla wszystkich analizowanych cech ilościowych (stężenia) sporządzono histogramy i przeprowadzono testy normalności ich rozkładów (z uwagi na małe liczebności w poszczególnych grupach (<30) skorzystano z testu Shapiro-Wilka). Ponadto podano dla nich wartości średnie \bar{x} , odchylenia standardowe s , wartości mediany Me oraz współczynniki skośności γ_3 .

Rozkład zbliżony do teoretycznego rozkładu normalnego (Gaussa) we wszystkich analizowanych grupach wykazywały następujące wielkości: stężenie nadtlenków (LPO_M) oraz stężenie cholesterolu (CH_M). Do porównania wyżej wymienionych cech wykorzystano test parametryczny t-Studenta, na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, natomiast w przypadku, gdy rozkład analizowanej cechy w którejś z porównywanych grup był asymetryczny, wykorzystano rangowany test nieparametryczny U Manna-Whitneya. Ponadto dla wszystkich analizowanych grup szczurów obliczono współczynniki korelacji r oraz parametry regresji liniowej (a i b).

Jednorodność wariancji badanych parametrów we wszystkich analizowanych grupach zbadano testem Bartletta. Ponieważ na przyjętym poziomie istotności $\alpha = 0,05$ wariancje nie różniły się znacząco, do porównania średnich wartości parametrów we wszystkich analizowanych grupach wykorzystano wieloczynnikową analizę wariancji (MANOVA). Przy

Tabela 1. Porównanie wartości stężenia ołowiu i kadmu we krwi dla 4 podgrup badanych szczurów ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of blood lead and cadmium concentrations in four subgroups of rats ($\bar{x} \pm s$)

Grupa Group	Pbk $\mu\text{g/l}$	Cdk $\mu\text{g/l}$
1) Grupa Pb Pb group n = 9	177,78 \pm 114,13	0,96 \pm 1,04
2) Grupa Cd Cd group n = 8	25,00 \pm 10,00	10,66 \pm 3,41
3) Grupa PbCd PbCd group n = 9	141,67 \pm 124,22	10,36 \pm 2,67
4) Grupa K K group n = 6	37,50 \pm 29,28	1,77 \pm 1,11
1)-2)	p = 0,001893	p = 0,000001
1)-3)	p = 0,529840	p = 0,000000
1)-4)	p = 0,012091	p = 0,171448
2)-3)	p = 0,018591	p = 0,837954
2)-4)	p = 0,278412	p = 0,000053
3)-4)	p = 0,067580	p = 0,000005

Pb_k - grupa ołowiowa (krew). Cd_k - grupa kadmu (krew).
Pb_k - lead group (blood). Cd_k - cadmium group (blood).
p - prawdopodobieństwo (pogrubienie - statystycznie istotne).
p - probability (bold - statistically significant).

omawianiu dwuczynnikowej analizy wariancji ograniczono się tylko do wyników wykazujących istotne zależności między badanymi wielkościami.

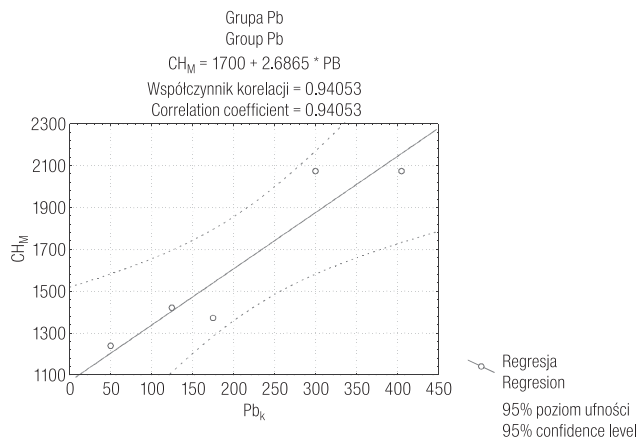
Średnie stężenie ołowiu we krwi było najwyższe w grupie szczurów zatrutowanych ołowiem oraz ołowiem i kadmem. Natomiast średnie stężenie kadmu we krwi było najwyższe w grupie szczurów zatrutowanych kadmem oraz kadmem i ołowiem (tab. 1).

Przeprowadzona analiza wariancji nie ujawniła wpływu ekspozycji na kadm oraz na ołów i kadm łącznie na stężenie ołowiu we krwi, podobnie jak nie wykazała zależności stężenia kadmu we krwi od narażenia na ołów oraz na ołów i kadm łącznie.

Oceniając średnie stężenia badanych parametrów w mózgu stwierdzono, że najwyższą zawartością cholesterolu charakteryzowały się mózgi szczurów zatrutowanych ołowiem, chociaż różnice między tą grupą a pozostałymi trzema nie były znaczące statystycznie (tab. 2).

Zależność między stężeniem ołowiu we krwi a zawartością cholesterolu w mózgu potwierdza istotna dodatnia korelacja między tymi parametrami w grupie szczurów zatrutowanych ołowiem (ryc. 2).

Podobnie nie stwierdzono znamiennych różnic między stężeniami nadtlenków lipidów, witaminy E i C oraz aktywnością SOD w mózgach trzech grup zatrutowanych szczurów: (Pb, Cd, Pb+Cd). Zwraca jednak uwagę fakt, że w grupie zatrutowanej ołowiem oraz kadmem i ołowiem stężenia nadtlenków lipidów były wyższe, a stężenia witaminy C i aktywność SOD niższe (choć nieznacznie) niż w grupie zatrutowanej samym kadmem. W tej ostatniej



Pb_k - grupa ołowiowa (krew). CH_M - cholesterol (mózg).
 Pb_k - lead group (blood). CH_M - cholesterol (brain).

Ryc. 2. Korelacja między stężeniem ołowiu ($\mu\text{g/l}$) we krwi a zawartością cholesterolu (mmol/l g tkanki) w mózgu w grupie Pb.

Fig. 2. Correlation between lead concentration ($\mu\text{g/l}$) in blood and cholesterol content (mmol/l g tissue) in the brain in the Pb group.

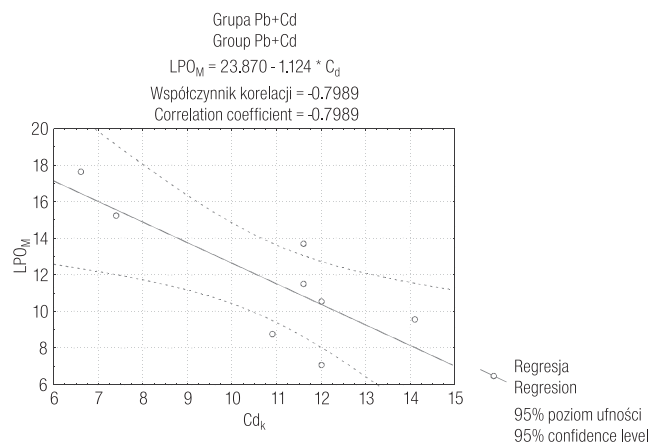
grupie stężenie nadtlenków lipidów w mózgach szczurów było istotnie niższe od stężenia tego parametru w mózgach szczurów grupy kontrolnej. Wykazano również, że stężenia nadtlenków lipidów, jak też poziom witaminy C w mózgach szczurów zatrutowanych ołowiem były znacząco niższe niż obserwowane w grupie kontrolnej. Spośród trzech grup zatrutowanych szczurów stężenie witaminy E w mózgu było najniższe w grupie zatrutowanej ołowiem i kadmem równocześnie (tab. 2).

Tabela 2. Porównanie wartości badanych parametrów w mózgu dla 4 podgrup badanych szczurów ($\bar{x} \pm s$)
Table 2. Comparison of values of the measurements parameters in the brains of four subgroups of rats ($\bar{x} \pm s$)

Grupa Group	CH mmol/l g tkanki	LPO nmol/ml	SOD U/mg białka	Vit. E $\mu\text{mol/l}$	Vit. C $\mu\text{mol/l}$
1) Grupa Pb group Pb	1681,56 \pm 378,06 n = 6	12,267 \pm 3,558 n = 13	21,00 \pm 13,19 n = 11	1,376 \pm 0,584 n = 12	3,383 \pm 1,629 n = 12
2) Grupa Cd group Cd	1207,14 \pm 681,23 n = 16	11,412 \pm 3,067 n = 18	23,556 \pm 15,751 n = 18	1,357 \pm 0,452 n = 18	4,253 \pm 2,133 n = 17
3) Grupa PbCd group PbCd	1344,49 \pm 569,45 n = 10	12,829 \pm 3,960 n = 12	20,792 \pm 17,838 n = 12	1,226 \pm 0,341 n = 12	3,473 \pm 0,751 n = 11
4) Grupa K group K	1334,43 \pm 658,15 n = 12	16,480 \pm 5,240 n = 10	16,111 \pm 12,930 n = 9	0,981 \pm 0,370 n = 10	7,140 \pm 5,911 n = 10
1)-2)	p = 0,125342	p = 0,479626	p = 0,656628	p = 0,922433	p = 0,245747
1)-3)	p = 0,220890	p = 0,711855	p = 0,975094	p = 0,450439	p = 0,869536
1)-4)	p = 0,252795	p = 0,031938	p = 0,416380	p = 0,079624	p = 0,047025
2)-3)	p = 0,600281	p = 0,279248	p = 0,658523	p = 0,399559	p = 0,256325
2)-4)	p = 0,623837	p = 0,003201	p = 0,232613	p = 0,033794	p = 0,077578
3)-4)	p = 0,970144	p = 0,077444	p = 0,513909	p = 0,122048	p = 0,054969

LPO - nadtlenki lipidów.
LPO - lipid peroxides.
Vit. C - witamina C.
Vit. C - vitamin C.
CH - cholesterol.
CH - cholesterol.

SOD - dysmutaza nadtlenkowa.
SOD - superoxide dismutase.
Vit. E - witamina E.
Vit. E - vitamin E.
p - prawdopodobieństwo (pogrubienie - statystycznie istotne).
p - probability (bold - statistically significant).



Cd_k – grupa kadmowa (krew). LPO_M – nadtlenki lipidów (mózg).
 Cd_k – cadmium group (blood). LPO_M – lipid peroxides (brain).

Ryc. 3. Korelacja między stężeniem kadmu ($\mu\text{g/l}$) we krwi a poziomem nadtlenków lipidów ($\mu\text{mol/ml}$) w mózgu w grupie Pb + Cd.

Fig. 3. Correlation between cadmium concentration ($\mu\text{g/l}$) in blood and lipid peroxides content ($\mu\text{mol/ml}$) in the brain in the Pb + Cd group.

Tabela 3. Zestawienie efektów zatrucia ołowiem i kadmem na stężenie nadtlenków lipidów w mózgu

Table 3. Aggregated effects of lead and cadmium poisoning on lipid peroxides concentration in the brain

Efekt Effect	Stopnie swobody Degrees of freedom	MS	Stopnie swobody Degrees of freedom	MS	Statystyka Statistics F	Poziom Level p
	Efekt główny Main effect		Reszta Others			
Pb	1	24,7564	49	14,92714	1,658480	0,203858
Cd	1	64,2782	49	14,92714	4,306132	0,043247
Pb i Cd	1	100,3671	49	14,92714	6,723802	0,012507

MS – średnie kwadraty odchyień.

MS – means squares.

p – prawdopodobieństwo (pogrubienie – statystycznie istotne).

p – probability (bold – statistically significant).

Tabela 4. Zestawienie efektów zatrucia ołowiem i kadmem na stężenie witaminy C w mózgu

Table 4. Aggregated effects of lead and cadmium poisoning on vitamin C concentration in the brain

Efekt Effect	Stopnie swobody Degrees of freedom	MS	Stopnie swobody Degrees of freedom	MS	Statystyka Statistics F	Poziom Level p
	Efekt główny Main effect		Reszta Others			
Pb	1	61,79943	46	9,176192	6,734757	0,012646
Cd	1	23,49964	46	9,176192	2,560935	0,116380
Pb i Cd	1	26,59915	46	9,176192	2,898713	0,095400

MS – średnie kwadraty odchyień.

MS – means squares.

p – prawdopodobieństwo (pogrubienie – statystycznie istotne).

p – probability (bold – statistically significant).

Tabela 5. Zestawienie efektów zatrucia ołowiem i kadmem na stężenie witaminy E w mózgu

Table 5. Aggregated effects of lead and cadmium poisoning on vitamin E concentration in the brain

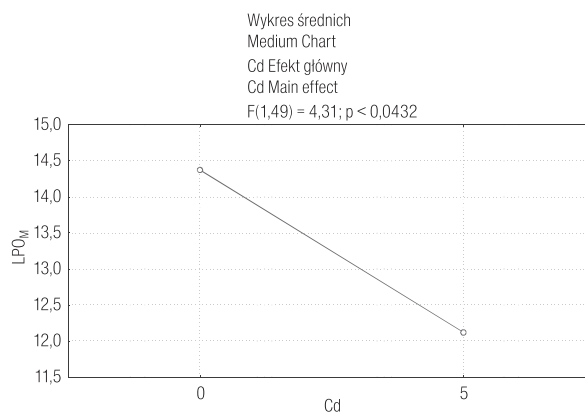
Efekt Effect	Stopnie swobody Degrees of freedom	MS	Stopnie swobody Degrees of freedom	MS	Statystyka Statistics F	Poziom Level p
	Efekt główny Main effect		Reszta Others			
Pb	1	0,215389	48	0,202955	1,061263	0,308090
Cd	1	0,158824	48	0,202955	0,782556	0,380770
Pb i Cd	1	0,859375	48	0,202955	4,234317	0,045068

MS – średnie kwadraty odchyień.

MS – means squares.

p – prawdopodobieństwo (pogrubienie – statystycznie istotne).

p – probability (bold – statistically significant).

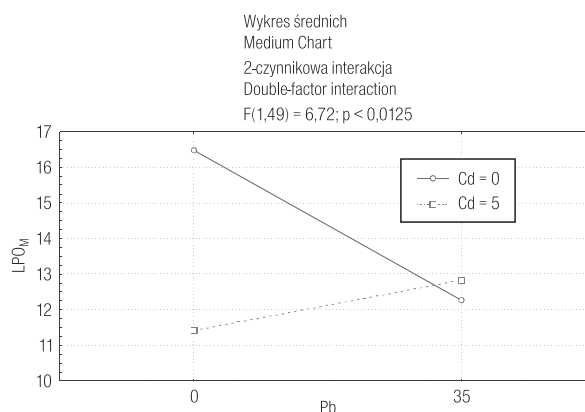


LPO_M – nadtlenki lipidów (mózg).

LPO_M – lipid peroxides (brain).

Ryc. 4. Zmiana średniej wartości stężenia nadtlenków lipidów w mózgu ($\mu\text{mol/ml}$) w zależności od ekspozycji na kadmi (mg/kg m.c.).

Fig. 4. Change in the mean value of lipid peroxides concentration in the brain ($\mu\text{mol/ml}$), depending on cadmium exposure (mg/kg m.c.).



LPO_M – nadtlenki lipidów (mózg).

LPO_M – lipid peroxides (brain).

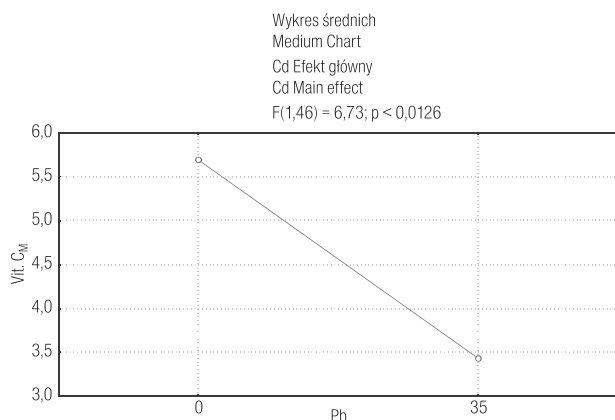
Ryc. 5. Zmiana średniej wartości stężenia nadtlenków lipidów ($\mu\text{mol/ml}$) w mózgu w zależności od ekspozycji na ołów i kadmi (mg/kg m.c.).

Fig. 5. Change in the mean value of lipid peroxides concentration in the brain ($\mu\text{mol/ml}$), depending on lead and cadmium exposure (mg/kg m.c.).

W badaniach korelacyjnych obserwowano natomiast istotną ujemną zależność między stężeniem kadmu we krwi a stężeniem nadtlenków lipidów w mózgu szczurów zatrutowanych jednocześnie ołowiem i kadmem (ryc. 3).

W analizie wariancji wykazano w mózgu dodatnią interakcję między ołowiem a kadmem w oddziaływaniu na nadtlenki lipidów (istotny wzrost stężenia LPO) (tab. 3) oraz jednocześnie obniżanie się stężenia LPO przy narażeniu na sam kadm (ryc. 4 i 5), a także ujemny wpływ jonów ołowiu na zawartość witaminy C w mózgu (tab. 4, ryc. 6).

Analiza wariancji ujawniła także ujemną interakcję między ołowiem a kadmem w oddziaływaniu na stężenie witaminy E w mózgu szczurów, podczas gdy nie stwierdzono takiego wpływu przy żadnym z metali podawanych osobno (tab. 5, ryc. 7).

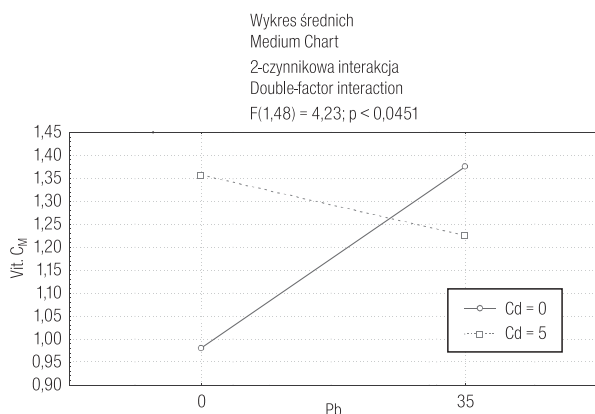


Vit. C_M – witamina C (mózg).

Vit. C_M – vitamin C (brain).

Ryc. 6. Zmiana średniej wartości stężenia witaminy C (μmol/l) w mózgu w zależności od ekspozycji na ołów (mg/kg m.c.).

Fig. 6. Change in the mean value of vitamin C concentration in the brain (μmol/ml), depending on lead exposure (mg/kg m.c.).



Vit. E_M – witamina E (mózg).

Vit. E_M – vitamin E (brain).

Ryc. 7. Zmiana średniej wartości stężenia witaminy E (μmol/l) w mózgu w zależności od ekspozycji na ołów i kadm (mg/kg m.c.).

Fig. 7. Change in the mean value of vitamin E concentration in the brain (μmol/ml), depending on lead and cadmium exposure (mg/kg m.c.).

OMÓWIENIE

Ekspozycja na ołów i kadm w środowisku człowieka jest ekspozycją złożoną. Efekty pojedynczego narażenia na każdy z tych metali są od dawna wnikliwie badane. Wiele prac badawczych, dotyczących skutków toksycznego działania tych ksenobiotyków, zarówno u ludzi jak i w doświadczeniach na zwierzętach, pozwoliło w dużym przybliżeniu ustalić mechanizmy tego działania. Są to jednak w większości badania z wykorzystaniem modelu zatrucia metalami w dużych dawkach. Pozwala to wywołać szybciej ujemne skutki, które ze względu na duże nasilenie ujawniają całą gamę reakcji organizmu zarówno w zakresie jego destrukcji jak i mechanizmów obronnych. Wyniki tych badań nie odzwierciedlają jednak rzeczywistych interakcji, zachodzących w środowisku człowieka. Należy pamiętać, że jesteśmy narażeni na wiele czynników szkodliwych (najczęściej w niskich stężeniach), a skutki ich wpływu dają się zauważyć dopiero w momencie nieodwracalnych zaburzeń. Niezwykle istotne wydaje się poznanie odpowiedzi organizmu na toksyny w małych dawkach, w tym metale ciężkie, zwłaszcza na poziomie molekularnym, a więc w początkowym okresie oddziaływania, co pozwoliłoby podjąć skuteczną ochronę przed niekorzystnymi, dalszymi konsekwencjami lub zwiększyć efektywność stosowanych terapii (13).

Ołów i kadm nie biorą bezpośredniego udziału w reakcjach wolnorodnikowych, poprzez cykl oksydoredukcyjny podobny do reakcji Fentona. Są jednak stymulatorami peroksydacji lipidów w układach *in vitro* np. we frakcjach błonowych wątroby. Za faktem działania prooksydacyjnego metali ciężkich, takich jak kadm i ołów, przemawia obserwacja zmian w zakresie antyoksydantów, które osłabiają toksyczność metali (14). Głównego mechanizmu działania metali upatruje się w zubożeniu organizmu w glutation wraz ze zmniejszeniem całkowitej puli grup sulfhydrylowych, związanych z białkami. Przy ekspozycji na ołów uszkodzenie błon mitochondrialnych *in vivo* może zachodzić pod wpływem działania kwasu 5-aminolewulinowego, którego zdolność do indukowania peroksydacji lipidów wykazano m.in. w bogatych w kardiolipinę liposomach (15).

Zaburzenia homeostazy metali endogennych powodują zmiany aktywności enzymów, które mogą być powiązane z działaniem toksycznym metali ciężkich. Zaburzenia metabolizmu pierwiastków endogennych pod wpływem metali ciężkich zachodzą jednakże nie tylko na poziomie współzawodniczenia do enzymów lub białek i rozmieszczenia pierwiastków w tkankach lub komórkach, ale także na poziomie wchłaniania jelitowego i indukcji syntazy metalotioneiny (2,14).

W badaniach prowadzonych w naszym ośrodku przed dwoma laty (16) opracowano model subklinicznego, złożonego zatrucia szczurów ołowiem i kadmem w małych dawkach, odpowiadających narażeniu środowiskowemu (35mg/kg m.c./tydzień ołowiu przez siedem tygodni oraz 5 mg/kg m.c./tydzień kadmu przez siedem tygodni). W grupie zatrutowanej obydwojema metalami równocześnie podawano te same dawki, co pozwala porównać efekty złożonej ekspozycji

cji ze skutkami pojedynczego narażenia. Oznaczano w tych badaniach zawartość ołowiu i kadmu w mózgu za pomocą spektrofotometru absorpcji atomowej. W naszej pracy doświadczalnej zastosowano identyczny model subklinicznego zatrucia na grupach szczurów tej samej rasy, płci, w tym samym wieku, pozostających na identycznej diecie w porównaniu ze zwierzętami użytymi do cytowanych badań, dlatego nie powtarzano pomiarów stężeń metali w badanych narządach. Wyniki pomiarów metabolizmu lipidów odniesiono do oznaczonych stężeń metali we krwi.

Wcześniejsze badania dotyczące kumulacji ołowiu i kadmu w poszczególnych narządach szczurów zatruciowych małymi dawkami tych metali podawanymi pojedynczo lub łącznie wykazały, że najwięcej ołowiu gromadzi się w mózgu badanych zwierząt przy ekspozycji złożonej, podczas gdy kumulacja kadmu w tym samym narządzie jest największa w grupie narażonej tylko na sam kadm (16–18).

Przeprowadzone przez autorów pracy badania wykazały, że w mózgu szczurów poddanych ekspozycji złożonej stężenia nadtlenków lipidów były wyższe, a stężenia witamin E i C oraz aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) niższe w porównaniu z grupami poddanymi ekspozycji pojedynczej, co mogłoby wskazywać, że wydolność mechanizmów adaptacyjnych (antyoksydacyjnych) jest mniejsza w grupie zatrucanej jednocześnie ołowiem i kadmem w porównaniu z grupami zatrucanymi osobno kadmem i ołowiem.

We wcześniej przeprowadzonych badaniach, Sandhir i wsp. (19) stwierdzili również, że u szczurów zatruciowych nieco większymi dawkami ołowiu dochodziło do gromadzenia tego metalu w różnych obszarach mózgu (największe stężenie obserwowano w hipocampie, a następnie w prążkowie, mózdzku, rdzeniu kręgowym, korze mózgowej i najniższe w pniu mózgu), ze znaczącym zwiększeniem peroksydacji lipidów i zahamowaniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationu (GSH-Px) i katalaza. Pod wpływem jonów ołowiu w różnych obszarach mózgu spadała także ilość zredukowanego glutationu (GSH), a wzrastała ilość utlenionego (GSSG), przez co obniżał się współczynnik GSH/GSSG. W następstwie narażenia na ołów, w komórkach nerwowych znacząco obniżała się też aktywność, związanej z błoną komórkową acetylocholinesterazy (AChE), której spadek aktywności korelował znamienne ze wzrostem peroksydacji lipidów (19). Inne wyniki uzyskano w przypadku mieszanego narażenia bydła i drobiu na małe dawki metali ciężkich (w tym ołowiu i kadmu), zawartych w podawanym im pokarmie, kiedy to obserwowano znaczący wzrost aktywności AChE w mózgu i mięśniach omawianych zwierząt hodowlanych (7). Prawdopodobnie wzrost aktywności AChE był niespecyficzną odpowiedzią organizmu, broniącego się przed toksycznym działaniem metali. Można przypuszczać, że te same metale w dawkach wyższych prowadzą do zahamowania aktywności tego enzymu.

Wzrost peroksydacji lipidów w mózgu szczurów zatruciowych ołowiem, z towarzyszącym podwyższeniem aktyw-

ności peroksydazy glutationu i niezmienną aktywnością SOD, wykazywali Adonaylo i Oteiza (15), którzy w swoim eksperymencie stwierdzili dodatkowo obniżenie zawartości ubiquinonu i niezmienną zawartość witaminy E w mózgu tych szczurów, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Brak jest jednoznacznej odpowiedzi, dotyczącej mechanizmu wykazanej dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem ołowiu we krwi a zawartością cholesterolu w mózgu u badanych szczurów. Mimo sprzecznych doniesień na ten temat, wzrost stężenia cholesterolu u zwierząt, którym podawano ołów, tłumaczy się między innymi stymulacją produkcji tego lipidu w wątrobie.

Wyniki badań mogą sugerować, że w wywoływaniu przez ołów zaburzeń neurotoksycznych dużą rolę odgrywa stres oksydacyjny i następowe, peroksydacyjne uszkodzenie błon komórkowych (6,15,19–21).

W innych obserwacjach homogenatów mózgu szczurów, zatruciowych przyżyciowo ołowiem, wykazano wzrost peroksydacji lipidów, którą nasilał kwas askorbinowy, a obniżały podawane jednocześnie z ołowiem alfa-tokoferol i hydrochinon (22). Badania z ostatnich lat sugerują, że ołów, nasilając procesy peroksydacyjne (wzmożona produkcja H_2O_2 , utlenianie lipidów), może inicjować mutagenezę, czyli procesy prowadzące do uszkodzenia DNA (23,24).

Jony kadmu, podobnie jak ołowiu, podwyższają zawartość LPO w mózgu szczurów (17,20) i w mikronaczyniach mózgowych tych zwierząt (25), podczas gdy wpływ kadmu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych jest odmienny od ołowiu. Przy krótkotrwałym narażeniu na kadm aktywność tych enzymów (SOD, PxGSH, reduktazy glutationu i katalazy) wzrasta, obniżając się znacząco przy kontynuacji ekspozycji. Shukla i wsp. sugerują, że wywołane przez kadm uszkodzenie bariery krew-mózg może wynikać z zahamowania obrony antyoksydacyjnej w mikronaczyniach mózgowych, z towarzyszącym wzrostem peroksydacji lipidów, przy dłuższej trwającym narażeniu (26). Zmiany w zapisie EEG oraz wydłużenie wrozkowych potencjałów wywołanych u samic szczurów, którym podawano związki kadmu wiąże się z nasileniem peroksydacji lipidów mózgowych przez ten metal (27–29).

Niewiele jest prac dotyczących skutków złożonej ekspozycji na różne toksyny w tym na ołów i kadm. Wyniki naszych badań sugerują, że małe dawki metali, działając prooksydacyjnie, stymulują równocześnie mechanizmy antyoksydacyjne (wyrażające się wzrostem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej SOD, stężenia witaminy E), z następowym obniżeniem stężenia nadtlenków lipidów w mózgu badanych zwierząt.

Przeprowadzone badania wykazały, że istnieją różnice w skutkach oddziaływania złożonej ekspozycji na metale, takie jak ołów (Pb) i kadm (Cd) w porównaniu do skutków pojedynczego ich stosowania u szczurów, a mianowicie, że zachodzi interakcja między ołowiem i kadmem we wpływie na nasilenie procesu peroksydacji lipidów. Wydaje się, że w mózgu szczurów występuje większy prooksydacyjny udział jonów ołowiu. Należy zaznaczyć, że podawane przez nas

dawki ołowiu i kadmu były względnie niskie. Metale w tych dawkach zdolne były do stymulowania mechanizmów antyoksydacyjnych, ale mechanizmy te mogłyby ulec załamaniu przy stosowaniu metali w większych dawkach.

Podsumowując należy stwierdzić, że peroksydacja lipidów błonowych odgrywa ważną rolę w toksyczności metali ciężkich, takich jak ołów i kadm. Trudno jednak, ze względu na szereg sprzecznych doniesień, powiedzieć czy stanowi ona na pewno najważniejszy mechanizm leżący u podstaw toksycznego działania metali. Wyniki naszych doświadczeń potwierdzają jednak konieczność prowadzenia dalszych badań nad wpływem złożonej ekspozycji na ksenobiotyki, jako odzwierciedlającej rzeczywisty stan narażenia człowieka oraz innych organizmów, tak zwierzęcych jak i roślinnych, w swoim naturalnym środowisku.

WNIOSKI

1) Ekspozycja pojedyncza i złożona na ołów i kadm w małych dawkach wywołuje w mózgu szczurów pobudzenie peroksydacji lipidów i w większym stopniu aktywację niektórych mechanizmów układu antyoksydacyjnego z następowym, wtórnym obniżeniem utlenionych form lipidów.

2) Mechanizmy antyoksydacyjne enzymatyczne i nieenzymatyczne są uruchamiane przede wszystkim w mózgu, którego struktura bogata w lipidy jest szczególnie podatna na procesy wolnorodnikowe.

3) Między ołowiem (Pb) i kadmem (Cd) zachodzi interakcja w oddziaływaniu na peroksydację lipidów u szczurów.

PIŚMIENNICTWO

1. Jakubowski M., Starek A., Ludwicki J., Knapik R., Barański B.: Słownik terminów stosowanych w toksykologii. Polskie Towarzystwo Toksykologiczne, „Secesja”, Kraków 1994.
2. Skoczyńska A., Andrzejak R.: Peroksydacja lipidów w patogenezie miażdżycy. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1997; 51 (5): 515–529.
3. Skoczyńska A., Smolik R., Jeleń M.: Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch. Toxicol.* 1993; 67: 200–204.
4. Skoczyńska A., Smolik R.: The effect of combined exposure to lead and cadmium on serum lipids and lipid peroxides level in rats. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 1994; 7: 263–271.
5. Antonowicz J., Andrzejak R., Lepetow T.: Influence of heavy metals, especially lead, on lipid metabolism, serum alpha-tocopherol level, total antioxidant status, and erythrocyte redox status of copper smelter workers. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998; 361: 365–367.
6. Adonaylo V.N., Oteiza P.I.: Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 1999; 135 (2–3): 77–85.
7. Bag S., Vora T., Ghatak R., Nilufer I., Dmello D., Pereira L. i wsp.: A study of toxic effects of heavy metal contaminants from sludge-supplemented diets on male Wistar rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1999; 42 (2): 163–170.
8. Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoń J.: Podstawy cytofizjologii. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
9. Satoh K.: Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new calorimetric method. *Clin. Chim. Acta.* 1978; 90 (1): 37–43.
10. Misra H.P., Greenwald R.A.: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* CRC Press, Boca Raton 1985.
11. Barua A.B., Kostic D., Olson J.A.: New simplified procedures for the extraction and simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols and carotenoids in human serum. *J. Chromatogr.* 1993; 617: 257–264.
12. Omaye S.T., Turnbull J.D., Sauberlich H.E.: Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissue, and fluids. *Meth. Enzymol.* 1979; 62: 3–11.
13. Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N.: Toxic metals and oxidative stress. I. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001; 1 (6): 529–539.
14. Gurer H., Ercal N.: Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29 (10): 927–945.
15. Oteiza P.I., Bechara E.J.H.: 5-Aminolewulinic acid induces lipid peroxidation in cardiolipin-rich liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 305 (2): 282–287.
16. Skoczyńska A.: Metabolizm lipidów, układ renina-angiotensyna i reaktywność naczyń u szczurów poddanych ekspozycji złożonej na ołów i kadm [rozprawa habilitacyjna]. Akademia Medyczna, Wrocław 1998.
17. Gupta A., Gupta A., Shukla G.S.: Development of brain free radical scavenging system and lipid peroxidation under the influence of gestational and lactational cadmium exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 1995; 14 (5): 428–433.
18. Jindal V., Gill K.D.: Ethanol potentiates lead-induced inhibition of rat brain antioxidant defense systems. *Pharmacol. Toxicol.* 1999; 85 (1): 16–21.
19. Sandhir R., Julka D., Gill K.D.: Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol. Toxicol.* 1994; 74: 66–71.
20. Strużyńska L., Walski M., Gadamski R., Dąbrowska-Bouta B., Rafałowska U.: Lead-induced abnormalities in blood-brain barrier permeability in experimental chronic toxicity. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1997; 31 (3): 207–224.
21. Villeda-Hernandez J., Barroso-Moguel R., Mendez-Armenta M., Nava-Ruiz C., Huerta-Romero R., Rios C.: Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res. Bull.* 2001; 55 (2): 247–251.
22. Shafiq-ur-Rehman, Rehman S., Chandra O., Abdulla M.: Evaluation of melondialdehyde as an index of lead damage in rat brain homogenates. *Biometals* 1995; 8 (4): 275–279.
23. Ye X.B., Fu H., Zhu J.I.: A study on oxidative stress in lead-exposed workers. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 1999; 56: 161–172.
24. Ariza M.E., Bijur G.N., Williams M.V.: Lead and mercury mutagenesis: role of H₂O₂, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998; 31 (4): 352–361.
25. Bagchi D., Vuchetich P.J., Bagchi M., Hassoun E.A., Tran M.X., Tang L., Stohs S.J.: Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (chromium VI) and cadmium chloride (cadmium II) to rats. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22 (5): 471–478.
26. Shukla A., Shukla G.S., Srimal R.C.: Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Hum. Exp. Toxicol.* 1996; 15: 400–405.

-
27. Yargicoglu P., Agar A., Oguz Y., Izgüt-Uysal V.N., Sentürk U.K., Oner G.: The effect of developmental exposure to cadmium (Cd) on visual evoked potentials (VEPs) and lipid peroxidation. *Neurotoxicol. Teratol.* 1997; 19 (3): 209–312.
28. Agar A., Yargicoglu P., Edremitlioglu M., Kara C., Oguz Y.: The effect of cadmium (Cd) treatment on somatosensory evoked potentials (SEPs) and conduction velocity in alloxane-induced diabetic rats: relation to lipid peroxidation. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 1999; 10: 41–56.
29. Agar A., Yargicoglu P., Sentürk U.K., Izgüt-Uysal V.N.: Effect of cadmium-induced lipid peroxidation on EEG spectral components. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 1999; 10 (1): 29–40.