

Maria Suska

WPŁYW ZWIĄZKÓW FLUORU NA METABOLIZM ERYTROCYTÓW

EFFECT OF FLUORINE COMPOUNDS ON METABOLISM OF ERYTHROCYTES

Z Katedry Biochemii

Uniwersytetu Szczecińskiego

Kierownik Katedry: prof. dr hab. A.J. Hłyńczak

STRESZCZENIE Za molekularny mechanizm regulacji stężenia nukleotydów w erytrocytach odpowiedzialne są enzymy procesu glikolizy, cyklu pentozowego i układów oksydoredukcyjnych. Zwrócono uwagę na konsekwencje pośredniego wpływu fluoru na zawartość ATP, ADP, AMP, pulę nukleotydów, ładunek energetyczny oraz 2,3 DPG. Wykazano także wpływ działania fluoru na aktywność ATP-azy. Med. Pr. 2001; 52; 2; 135–138

ABSTRACT The molecular mechanism for regulating nucleotide contents depends on the activity of numerous enzymes during glycolysis, pentose cycle and oxidation-reduction system. Special attention was paid to the consequences of indirect effects of fluorine on ATP, ADP and AMP contents, nucleotide pool, energetic charge and the amount of 2,3 DPG. The effects of fluorine on ATP-ase activity are also described. Med Pr 2001; 52; 2; 135–138

KEY WORDS: fluorine, erythrocytes, adenine nucleotide, 2,3-DPB, enzymes

Poziom nukleotydów adeninowych rzuca pewne światło nie tylko na przemiany tych związków i ich wzajemne regulacje w samych erytrocytach, w warunkach fizjologicznych i patologicznych, ale także jest pomocny w kontroli wpływu różnych substancji toksycznych w monitorowaniu środowiska (1). Krwinki czerwone charakteryzują się prostą budową, łatwością pozyskania i znacznym stopniem poznania i dlatego wykorzystuje się je jako komórki modelowe w różnych badaniach fizjologicznych, patologicznych i toksykologicznych (2–9).

Młode krwinki posiadają różne szlaki metaboliczne, ale wraz z dojrzewaniem tracą wszystkie organella, a w związku z tym zanika w nich aktywność enzymów łańcucha oddechowego, przemiany lipidów, syntezy białka, kwasów nukleinowych, hemu i niektórych z cyklu Krebsa (10,11). Jedynym źródłem energii dla zapewnienia prawidłowego kształtu i funkcji erytrocytów są nukleotydy adeninowe (ATP, ADP, AMP), 2,3-DPG, NADH i NADPH, które to powstają w procesie glikolizy i cyklu pentozowym (11,12). Za regulację metabolizmu komórkowego odpowiedzialne są 3 układy transportujące energię: fosforany adenozyne, NAD i NADP (12).

NAD w tym układzie decyduje o ładunku redukcji katabolicznej, którą definiuje się jako $\text{NADH}/\text{NADH} + \text{NAD}^+$, natomiast ładunek redukcji anabolicznej wyraża się stosunkiem $\text{NADPH}/\text{NADPH} + \text{NADP}^+$ (11,12). Zmiany w obrębie wymienionych układów są zależne od aktywności wielu enzymów (13). System regulacji enzymatycznej zapewnia erytrocytom odnawianie rezerw energetycznych i utrzymanie równowagi oksydoredukcyjnej dla: 1) zachowania struktury erytrocytów; 2) utrzymania w stanie zredukowanym Fe w pierścieniach hemowych Hb; 3) utrzymania stałości składu wewnątrzkomórkowego; 4) zachowania różnic w stężeniach kationów pomiędzy osoczem a krwinką (13). Za molekularny mechanizm regulacji poziomu nukleotydów w krwinkach czerwonych odpowiedzialne więc są enzymy procesu glikolizy, cyklu pentozowego i układów oksydore-

dukcyjnych. Większość tych enzymów, to enzymy magnezozależne, których inhibitorem są m. in. jony fluorkowe.

Szczegółowe poznanie patomechanizmu zatrucia fluorem było przedmiotem wielu prac, zwłaszcza w ostatnich latach (2,4,5,7,14–19). W miarę rozwoju badań poznano właściwości biofizykochemiczne tego pierwiastka, jego powinowactwo do wapnia i magnezu, a także żelaza, miedzi, cynku, molibdenu, manganu i glinu (19).

Fluor, jako halogen o najmniejszej masie i najmniejszym promieniu jonowym, wykazuje dużą reaktywność (19) i bardzo dużą elektroujemność, która może modyfikować rozmieszczenie elektronów w cząsteczce, wpływając na absorpcję, dystrybucję i metabolizm (20). Do krwi zostaje wchłonięty z przewodu pokarmowego i z płuc. Osocze krwi zawiera fluorki zarówno w postaci jonowej jak i niejonowej (19,21). Na ogół poziom fluorków we krwi jest niski, ponieważ są one sprawnie wydalane przez nerki i wychwytywane przez układ kostny. Jednak, gdy ich zawartość zaczyna przekraczać podwójną ilość w moczu i we krwi w odniesieniu do osób kontrolnych, wtedy zauważa się oddziaływanie jego na liczne metaloenzymy, zarówno w płynach ustrojowych, jak i w narządach i w tkankach (19).

Fluor ma dużą zdolność do przenikania przez błony komórkowe, lecz jego rozmieszczenie w osoczu i w erytrocytach nie jest równomierne. Gumińska (5) podaje, że około 75% fluoru występuje w osoczu, a tylko 25% w erytrocytach. Erytrocyty zatem posiadają specjalny mechanizm chroniący je przed wnikaniem fluorków lub pozwalający na ich eliminację.

Mechanizm transportu fluoru nie jest dokładnie poznany. Stwierdzono, że w błonie komórkowej erytrocytów za transport anionów odpowiedzialne jest białko pasma 3, a jony Ca^{2+} i Mg^{2+} modulują ten transport (22). Przypuszcza się, że pasmo 3 jest zespołem białek o podobnej masie cząsteczkowej, położeniu i orientacji, spełniającym różne specyficzne funkcje związane z transportem przez błonę (22). Białko

pasma 3 jest białkiem integralnym, zanurzonym w dwuwarstwie lipidowej, a ułożenie jego jest asymetryczne i ma kontakt z zewnętrzną jak i wewnętrzną stroną błony. Bierze ono także udział w transporcie wody do erytrocytów (22) i być może także w przenikaniu anionu fluorkowego z osocza do krwinek czerwonych.

Gumińska (23) uważa, że jony fluorkowe usuwane są z erytrocytów na zasadzie aktywnego transportu wbrew gradientowi stężeń z użyciem ATP. Jej zdaniem, fluorki ulegają fosforylacji do fluorofosforanu przez ATP w obecności Mg^{2+} . Fluorofosforan byłby zatem aktywną formą fluorku, służącą do jego eliminacji z erytrocytów.

W błonach krwinek odpowiedzialne za transport aktywne są trzy ATP-azy: K^+ , Na^+ ATP-aza, Mg^{2+} ATP-aza, Mg^{2+} , Ca^{2+} ATP-aza (24). Są to tioenzymy, wymagające dla swej aktywności obecności jonów magnezu. W ostatnim czasie pojawiły się prace wskazujące na możliwość hamowania tych enzymów przez różne substancje toksyczne, a także przez fluorki (14,25,26,27). W doświadczeniach *in vitro* (15), prowadzonych na ludzkich erytrocytach, traktowanych fluorkiem sodu o różnych stężeniach, stwierdzono wyraźne hamowanie aktywności K^+ , Na^+ ATP-azy wrażliwej na oubainę, natomiast nieznacznie obniżyła się aktywność Mg^{2+} ATP-azy. Hamowanie K^+ , Na^+ ATP-azy było proporcjonalne do stężenia fluorków. Przy stężeniu F^- 1,9 mg/l, czyli przy stężeniu odpowiadającym poziomowi we krwi w ostrych toksycznych ekspozycjach środowiskowych, aktywność ATP-azy osiągała około 50% aktywności kontrolnej (15). Podobną zależność wykazano w badaniach *in vivo*, dla aktywności K^+ , Na^+ ATP-azy z błon erytrocytów ludzi, żyjących w zanieczyszczonym środowisku, zatrwanym przez Zakłady Azotowe, Hutę Stali i Zakłady Mięsne (28).

W przebadanej populacji zaobserwowano przekroczenie 2–4-krotnie normy poziomu fluorków w moczu (29). Stwierdzono także korelację pomiędzy zmniejszeniem aktywności K^+ , Na^+ ATP-azy a wzrostem wydalania fluorków z moczem. Zahamowanie aktywności tego enzymu w erytrocytach pod wpływem fluoru można odnieść do błon innych komórek, a szczególnie do tkanki mięśniowej i nerwowej (4,28). Spadek aktywności K^+ , Na^+ ATP-azy przyczynia się do obniżenia potencjałów błonowych spoczynkowych i czynnościowych (30). Podobne zmiany mogą być wywołane przez inne czynniki toksyczne, jak np. ołów (31). Inhibicyjny wpływ jonów fluorkowych dotyczy wielu enzymów biorących udział w różnych szlakach metabolicznych (4,18,19). Fluorek może działać bezpośrednio na białko enzymatyczne, zmieniając jego strukturę, przez rozerwanie wiązań wodorowych, albo pośrednio, poprzez wychwytywanie kationów aktywujących poszczególne enzymy. Zdaniem Machoya (19), istnieją trzy możliwości hamującego działania fluorków na enzymy: 1) konkurencja fluorku z anionem o miejsce katalityczne enzymu; 2) wiązanie się fluorku z enzymem w miejscu nie katalitycznym, co nie przeszkadza w tworzeniu się kompleksu ES, lecz kompleks ten nie może zdysocjować; 3) fluorek

wbudowuje się do enzymu już po związaniu substratu i wtedy kompleks ES także nie dysocjuje.

Badania nad mechanizmem działania fluorków na aktywność różnych enzymów są zawsze otwarte i z roku na rok zostają wzbogacone o nowe fakty. Dotychczasowe doniesienia o wpływie fluorków na enzymy magnezozależne utrwały pogląd, że jony te hamują aktywność enzymów regulatorowych procesu glikolizy i cyklu pentozowego, co ma bezpośredni związek z poziomem nukleotydów adeninowych i 2,3-DPG w erytrocytach.

Fluorki przez wiązanie magnezu i tworzenie kompleksów magnezofluorofosforanowych (4), blokują regulatorowe enzymy w szlaku utylizacji glukozy, takie jak: heksokinazę (E. C. 2.7.1.1) i fosfofruktokinazę (E. C. 2.7.1.11) (2), hydratę fosfopirogronianową (enolazę) (E. C. 2.7.1.40) (4, 28) oraz fosfoglukomutazę (E. C. 2.7.5.1) i fosfogliceromutazę (E. C. 2.7.5.3) (33,34,35).

Badania *in vitro* wykazały, że największe zahamowanie glikolizy przez fluorki zaznacza się przy najmniejszym stężeniu magnezu w środowisku (36). W obecności fluorków ilość tworzonego ATP i mleczanu zmniejsza się, ale efekt ten można częściowo zneutralizować poprzez podwyższenie poziomu magnezu. Podobny efekt wpływu magnezu na poziom ATP w erytrocytach, glukozy i mleczanu we krwi, był obserwowany w warunkach *in vivo* u ludzi narażonych na ekspozycję fluorków (7).

Skutki działania fluorku na zawartość ATP, ADP, AMP i 2,3-DPG w zależności od czasu ekspozycji jak i wielkości dawki był stwierdzony w badaniach eksperymentalnych na szczurach (9). Już po pierwszym miesiącu ekspozycji zarówno po dawce 4 ppm i 16 ppm zaznaczył się istotny spadek stężenia ATP i ADP oraz wzrost zawartości AMP w erytrocytach, przy jednoczesnym wzroście stężenia fluorków w surowicy. Znamienny spadek zawartości ATP i ADP miał wpływ na wysoko istotne obniżenie się puli nukleotydów oraz potencjału energetycznego erytrocytów. Należy tu jednak zaznaczyć, że wzrostowi stężenia AMP w erytrocytach towarzyszył istotny wzrost stężenia 2,3-DPG, głównego metabolitu regulującego uwalnianie tlenu do tkanek. Askari i Roa (37) dowiedli, że 2,3-DPG w krwinkach czerwonych jest inhibitorem deaminazy AMP. Obecna w erytrocytach deaminaza AMP, może być hamowana z jednej strony przez jony fluorkowe (38), a z drugiej przez 2,3-DPG (37). Ponieważ stężenie AMP i ATP w normalnych komórkach jest odwrotnie proporcjonalne, zatem AMP jest efektem dodatnim, a ATP efektem ujemnym procesów metabolicznych (39). Miarą równowagi między zużyciem energii zawartej w ATP poprzez hydrolizę a produkcją tego związku jest potencjał energetyczny ECP (energy charge potential) (39). Analizując zmiany ECP u badanych szczurów po 4-tygodniowej ekspozycji na NaF, stwierdza się istotny jego spadek, co ma ścisły związek z obniżeniem puli nukleotydów (9).

Badania nad metabolizmem energetycznym krwinek czerwonych, prowadzone w różnych warunkach *in vitro* i *in vivo* potwierdzają, że fluorki hamując bezpośrednio aktyw-

ność enzymów magnezozależnych procesu glikolizy, pośrednio wpływają na poziom nukleotydów adeninowych, potencjał energetyczny, pulę nukleotydów oraz 2,3-DPG w erytrocytach. Przy niskim stężeniu ATP erytrocyty tracą wodę, jony potasu, zniszczeniu ulega sieć spektrynowo-aktywna błony komórkowej, co powoduje zmianę stosunku powierzchni zewnętrznej do wewnętrznej w dwuwarstwie lipidowej i zmianę kształtu erytrocytu z dwuwklęsłego dysku na echiocyt (40).

Krwinki czerwone, jako komórki modelowe, są wykorzystywane do badań nad wpływem różnych czynników egzogenicznych na metabolizm komórkowy. Zmiany jakie zachodzą w bioenergetyce, właściwościach fizykochemicznych i w strukturze komórek pod wpływem czynników toksycznych można odnieść do komórek innych tkanek (5,23). A zatem stwierdzony w warunkach *in vitro* inhibicyjny wpływ fluororku sodu na aktywność enzymów przemiany glukozy zarówno w erytrocytach, jak i w oczyszczonych preparatach wątroby, mięśni szkieletowych, a także w komórkach raka Erlicha (4), może świadczyć o przydatności tych badań.

PIŚMIENNICTWO

- Hahlon C., Kennicutt H.: ATP as an indicator of toxicity. *Water Res.* 1980, 14, 4, 125–128.
- Bowman R.H.: Inhibition of citrate metabolism by sodium fluoroacetate in the perfused Rat heart and the effect on phosphofructokinase activity nad glucose utilization. *Biochem. J.* 1964, 93, 13c–15c.
- Feig S.A.: Energy metabolism in human erythrocytes. I. Effects of sodium fluoride. *J. Clin. Invest.* 1971, 50, 1731–1737.
- Gumińska M.: Biochemiczne mechanizmy działania fluoru na żywy organizm. *Folia Med. Cracov.* 1981, 23, 305–321.
- Gumińska M.: Chemiczne substancje toksyczne w środowisku i ich wpływ na zachowanie człowieka. Kraków, PWN, 1990.
- Hłyńczak A.J., Suska M., Szyszka K.: Wpływ chlorku winylu na poziom nukleotydów adeninowych, pulę nukleotydów i ładunek energetyczny krwinki czerwonej. *Bromat.* 1990, 23, 35–37.
- Kędryna T., Marchut E., Gumińska M.: Biochemiczne wskaźniki przemiany węglowodanowej u mieszkańców Chorzowa przewlekle narażonych na zanieczyszczenia przemysłowe. *Folia Med. Cracov.* 1991, 32, 103–110.
- Miseta A., Bogner P., Berenyi E., Kellermayer M., Galambos C., Wheatley N. D. i wsp.: Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentration in mammalian and avian erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1175, 133–139.
- Suska M.: Metabolizm energetyczny krwinek czerwonych u zwierząt hodowlanych i doświadczalnych narażonych na działanie związków fluoru [praca doktorska]. Szczecin, Uniwersytet Szczeciński, 1985.
- Kwiatkowska J.: Enzymy krwinki czerwonej a jej struktura i funkcja. *Post. Biochem.* 1989, 35, 575–584.
- Lehinger A.L.: Bioenergetyka. Warszawa, PWN, 1978.
- Jóźwiak Z.: Udział nukleotydów adeninowych w regulacji struktury i właściwości erytrocytów. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1985, 35, 116–132.
- Bogusławska-Jaworska J.: Wrodzone niedokrwistości hemolityczne związane z niedoborem enzymów krwinek czerwonych. *Przeg. Ped.* 1985, 15, 1–11.
- Farias R.N., Goldemberg A.L., Trucco R.E.: The effect of fat deprivation on the allosteric inhibition by fluoride of the (Mg^{2+}) -ATPase and (Na^+, K^+) -ATPase from rat erythrocytes. *Arch. Biochim. Biophys.* 1970, 139, 38–44.
- Grabowska M., Gumińska M.: Wpływ fluororku sodowego na ATP-azy aktywowane magnezem z błon erytrocytów. *Folia Med. Cracov.* 1995, 26, 29–33.
- Jagiello G., Lin J.: Sodium fluoride as a potential mutagen in mammalian eggs. *Abstr. Arch. Environ. Health* 1974, 29, 230–235.
- Korkmaz O.: In vitro effects of sodium fluoride and sodium dichromate on dynamic properties of human erythrocyte membrane. *Biophys. Chem.* 2000, 83, 2, 111–120.
- Machoy Z.: Wpływ związków fluoru na łańcuch oddechowy. *Bromat.* 1981, 14, 101–105.
- Machoy Z.: Biochemiczne mechanizmy działania związków fluoru. *Folia Med. Cracov.* 1987, 28, 1–2, 61–81.
- Waxselman C.: Fluorinated organic compounds: synthesis and biological applications. *Ann. Pharm. Fr.* 1999, 57, 2, 108–115.
- Singer L., Ophaug R.: Ionic and nonionic fluoride in plasma. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1982, 18, 111–140.
- Herzyk E.: Fosforylacja białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich. *Post. Biochem.* 1982, 28, 251–277.
- Gumińska M.: Influence of fluorides on energy metabolism *in vitro* and *in vivo* related biological effects. *Metabolism of Fluoride*. Szczecin, Akademia Medyczna, 1994.
- Drickamer L. K.: The red cell membrane contains three different adenosine triphosphates. *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 1952–1954.
- Auland M.E., Morris M.B., Roufogalis B.D.: Separation and characterization of two (Mg^{2+}) -ATPase activity from the human erythrocyte membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, 312, 1, 272–277.
- Morris M.B., Monteith G., Roufogalis B.D.: The inhibition of ATP-dependent shape change of human erythrocyte ghosts correlates with an inhibition of (Mg^{2+}) - ATP activity by fluoride and aluminofluoride complexes. *J. Cell Biochim.* 1982, 48, 4, 356–366.
- Yoshida H., Nagai K., Kamel M., Nakagawa Y.: Irreversible inactivation of (Na^+, K^+) -dependent ATP-ase and K^+ -dependent phosphatase by fluoride. *Biochim. Biophys. Acta* 1968, 150, 162–164.
- Grabowska M., Gumińska M., Ignacak J.: Hamujący wpływ zanieczyszczeń środowiska na aktywność ATPazy z błon erytrocytów ludzi. *Folia Med. Cracov.* 1991, 32, 1–2, 103–110.
- Ignacak J., Gumińska M., Stachurska M.B.: Fluoride and magnesium in urine of humans living in polluted environment. *Arch. Ochr. Środow.* 1990, 3–4, 117–122.
- Bełtowski J.: Mechanizmy regulacji (Na^+, K^+) -ATPazy w nabłonku kanalików nerkowych. *Post. Bioch.* 1998, 44, 4, 282–291.
- Ignacak J., Brandys., Danek M., Moniczewski A.: Biochemical effect of lead in humans living in the polluted environment. *Arch. Ochr. Środow.* 1990, 3–4, 135–140.
- Gumińska M., Skowron-Sula M.: Wpływ różnych stężeń jonów magnezowych i fluorkowych na glikolizę erytrocytów *in vitro*. *Folia Med. Cracov.*, 1985, 26, 35–41.
- Jelkmann W., Bauer C.: High pyruvate kinase activity causes low concentration of 2,3-diphosphoglycerate in fetal rabbit red cells. *Pflügers Arch.* 1978, 375, 189–195.

34. Jalkmann W., Bauer C.: 2,3-DPG levels in relation to red cell enzyme activities in rat fetuses and hypoxic newborns. *Pflügers Arch.* 1980, 389, 61–68.
35. Jelkmann W., Bauer C.: Regulation of red cell DPG metabolism in fetuses and adults. *Acta Biol. Med. Germ.* 1981, 40, 661–664.
36. Gumińska M., Kędryna T., Marchut E., Stachurska M.B.: ATP, glukoza i mleczan krwi u ludzi przewlekle narażonych na działanie fluory przed i po profilaktycznym zastosowaniu soli magnezu. *Folia Med. Cracov.* 1985, 26, 93–97.
37. Askari A., Roa S.N.: Regulation of AMP deaminase by 2,3-diphosphoglyceric acid a possible mechanism for the control of adenine nucleotide metabolism in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1968, 151, 198–203.
38. Markiewicz W.: Cykl nukleotydów purynowych. *Post. Biochem.* 1979, 25, 169–195.
39. Atkinson D.E.: Regulation of enzyme activity. *Ann. Rev. Biochem.* 1966, 35, 85–118.
40. Sikorski A., Białkowska K., Bisikirska B., Szopa J.: Spektryna erytrocytarna i nieerytrocytarna- struktura i funkcja. *Post. Biochem.* 1993, 39, 50–60.

Adres autorki: Felczaka 3a, 71-412 Szczecin

Nadesłano: 19.12.2000

Zatwierdzono: 12.03.2001