

Wpływ środowiskowego zanieczyszczenia przemysłowego związkami fluoru na zawartość nukleotydów adeninowych w erytrocytach u krów rasy czarno-białej

MARIA SUSKA

Katedra Biochemii Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego, ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin

Suska M.

The influence of environmental pollution with fluorine compounds on the content of adenine nucleotides in erythrocytes of Black and White cows

Summary

The effects of fluorine compounds emitted by „Police” Chemical Industry on the adenine nucleotide concentrations (ATP, ADP, AMP) in the erythrocytes and full blood of 26 Black and White cows were examined. The influence of this compound on the nucleotide pool and adenylate energy charge of the red cells in the same cows was determined. An increase of ATP, ADP concentration and in the nucleotide pool in erythrocytes and full blood was observed. However no changes in adenylate energy charge of erythrocytes and fluoride concentration in the serum were found in comparison to reference [control?] groups.

Keywords: adenine nucleotides, fluorine, erythrocytes, cows

Toksyczne działanie związków fluoru objawia się ostrym lub przewlekłym zatruciem, które u zwierząt hodowlanych, a zwłaszcza u bydła powoduje występowanie biegunek, niedowłady, zahamowanie produkcji mlecznej, odbarwienie szkliwa zębów, bolesność nasad kości długich i ich odwapnienie oraz nie pobieranie wody (2). Opisane zmiany pojawiają się stosunkowo późno, zaś znacznie wcześniej, obserwuje się zaburzenia metaboliczne poszczególnych układów, narządów, tkanek i komórek (16, 19, 23, 24).

Obecnie opisano około 70 enzymów wrażliwych na fluorki, których inhibicja prowadzi do pojawiania się różnych efektów biologicznych, o różnych mechanizmach działania (5, 14). W erytrocytach zaburzenia metaboliczne są wynikiem powinowactwa fluoru do jonów wapniowych i magnezowych (4, 5, 6). W badaniach dotyczących metabolizmu krwinki czerwonej zwraca się zatem szczególną uwagę na kluczowe enzymy jedynej drogi regenerującej energię, jaką jest proces glikolizy. Wykazano, że jony fluoru blokują specyficzne enzymy przemiany glukozy takie jak: heksokinaza (EC 2.7.1.1), fosfofruktokinaza (EC 2.7.1.11), hydratasa fosfopirogronianowa (EC 4.2.1.11) oraz kinaza pirogronianowa (EC 2.7.1.40) (4, 14).

Bezpośredni spadek aktywności enzymów na skutek inhibicji fluorowej, pośrednio wpływa na syntezę związków energetycznych w erytrocytach. Ponieważ wykładnikiem efektywności procesów energetycznych

w krwinkach czerwonych są nukleotydy adeninowe ATP, ADP i AMP, które ulegają odwracalnym przemianom dzięki procesom glikolizy i cyklu pentozowego (10), postanowiono określić ich stężenie w erytrocytach i w pełnej krwi u krów eksponowanych przewlekłe na związki fluoru.

Celem pracy było oznaczenie stężenia ATP, ADP, AMP w pełnej krwi i w erytrocytach oraz wyznaczenie wartości puli nukleotydów i potencjału energetycznego krwinek czerwonych, a także określenie stężenia fluoru w surowicy krwi u bydła hodowanego w bliskim sąsiedztwie Zakładów Chemicznych „Police”.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w okresie jesienno-zimowym na 26 krowach rasy nizinnej czarno-białej w wieku około 3-4 lat, hodowanych w prywatnych gospodarstwach w strefie 2-3 km w kierunku południowo-wschodnim od Zakładów Chemicznych „Police”. W badaniach weterynaryjnych, krowy wykazywały różne stopnie zaawansowania fluorozu, wchłaniały bowiem fluorki, nie tylko z powietrza i wody, ale dodatkowo jeszcze poprzez skażoną paszę. Grupę referencyjną stanowiły zwierzęta tej samej rasy z terenów oddalonych o ponad 100 km na południe od Polic, hodowane w gospodarstwie Korytowo, w wieku 3-4 lat, w liczbie 30 sztuk. Krowy żywiono sianem, kiszoną kukurydzą i burakami pastewnymi, pochodzącymi z czystych ekologicznie terenów.

Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej w godzinach rannych do dwóch probówek (w różnych ilościach). Do probówki szklanej z heparyną – 7 ml krwi, a do plastikowej – 5 ml na skrzep. Próbkę krwi przewożono do laboratorium w termosach z lodem i poddawano natychmiast analizie.

We krwi heparynowej oznaczono: liczbę hematokrytową z zastosowaniem wirówki hematokrytowej i czynnika oraz po dokładnym odbiałczeniu krwi kwasem nadchlorowym, określano związki fosforanowe we frakcji kwasorozpuszczalnej krwinek czerwonych, a mianowicie: ATP, ADP i AMP za pomocą zestawu odczynników Biochemica Test Combination (Boehringer, Manhein). Reakcje enzymatyczne wymienionych testów, które w końcowym etapie powodują zmianę absorbancji badanej próbki przy 340 nm, oparte są na metodzie Schmidta (21).

Krew w probówkach plastikowych po skrzepnięciu wirowano 15 min. przy 2000 obr/min. W surowicy krwi oznaczono stężenie fluoru metodą wg Maruta (17).

Uzyskane wyniki badań dla krów grupy narażonej na działanie związków fluoru i krów grupy referencyjnej wyrażone w jednostkach właściwych dla metody w układzie SI, opracowano statystycznie posługując się testem t-Studenta (25).

Wyniki i omówienie

Stwierdzono statystycznie istotny wzrost stężenia ATP ($p \leq 0,05$) i ADP ($p \leq 0,01$) w erytrocytach i w pełnej krwi u krów narażonych na działanie związków fluoru w porównaniu do grupy referencyjnej (tab. 1). Wzrostowi stężenia ATP i ADP towarzyszył spadek stężenia AMP w krwinkach czerwonych i w pełnej krwi u zwierząt narażonych. Jednak różnica ta nie była statystycznie istotna.

Pula nukleotydów adeninowych u krów narażonych była istotnie wyższa w porównaniu z grupą referencyjną ($p \leq 0,01$), zaś wartość potencjału energetycznego była nieco wyższa niż w grupie referencyjnej, lecz różnica ta nie wykazywała statystycznej istotności (tab. 2). Analizując stężenie fluorków w surowicy krwi u krów narażonych (109,41 $\mu\text{mol/l}$) w porównaniu z grupą referencyjną (94,15 $\mu\text{mol/l}$) stwierdzono ich wzrost w surowicy, lecz różnica ta nie mieściła się również w granicach statystycznej istotności.

Jon fluorkowy wchłonięty do krwi z przewodu pokarmowego i z płuc jest częściowo wydalany z moczem, kałem i potem. Przy ciągłym dopływie z zewnątrz, jest on kumulowany głównie w zębach i kościach w postaci fluoroapatytów. We krwi łączy się przede wszystkim z białkami osocza, szczególnie z albuminami (4). Ta postać fluoru nie jest aktywna biologicznie, lecz stanowić może pewien jego „magazyn”. Podano, że poziom fluoru w krwinkach czerwonych osiąga wartość dwukrotnie niższą niż w osoczu (4). Jedynie postać wolnego jonu w erytrocytach, wpływa

Tab. 1. Stężenie nukleotydów adeninowych ($\mu\text{mol/l}$) w erytrocytach i we krwi pełnej u krów narażonych na działanie związków fluoru ($\bar{x} \pm s$)

Grupa	ATP (n = 26)		ADP (n = 26)		AMP (n = 24)	
	Erytrocyty	Pełna krew	Erytrocyty	Pełna krew	Erytrocyty	Pełna krew
Badana	534,99*	171,24*	187,22**	59,91**	23,75	7,59
	62,579	28,074	48,088	14,858	5,725	2,818
Referencyjna	377,69	124,64	119,43	39,43	27,86	9,19
	53,074	24,489	40,387	8,737	9,296	3,130

Objaśnienia: * różnica istotna przy $p \leq 0,05$, ** przy $p \leq 0,01$.

Tab. 2. Wartości potencjału energetycznego oraz puli nukleotydów adeninowych w erytrocytach u krów narażonych na związki fluoru (n = 24; $\bar{x} \pm s$)

Grupa	Potencjał energetyczny	Pula nukleotydów w $\mu\text{mol/l}$
Badana	0,848 \pm 0,2012	745,96* \pm 117,074
Referencyjna	0,834 \pm 0,0399	524,98 \pm 113,923

Objaśnienie: * różnica istotna przy $p \leq 0,01$.

hamująco na aktywność enzymów związanych z procesem glikolizy (5, 24) i ma znaczący wpływ na poziom nukleotydów adeninowych, potencjał energetyczny i pulę nukleotydów. Na podstawie uzyskanych wyników z pomiaru zawartości fluoru całkowitego w surowicy, wstępnie można wnioskować, że krowy ekspozowane przez 3-4 lata na fluor mogły uruchomić pewne mechanizmy adaptacyjne, związane z dystrybucją tego pierwiastka w organizmie. Być może stabilizacja mechanizmów wyrównawczych do poziomu bezpiecznego we krwi zaczyna się po określonym czasie ekspozycji. Zaburzenia w metabolizmie glukozy i gospodarce energetycznej są zwykle powiązane z zaburzeniami gospodarki mineralnej (5). Jakościowe i ilościowe rozmieszczenie poszczególnych elektrolitów w erytrocytach u różnych gatunków zwierząt, a nawet u różnych ras tego samego gatunku jest często zdecydowanie inne. Na przykład w erytrocytach wielu odmian owiec i bydła przeważają kationy Na^+ , podczas gdy u wielu innych ssaków, jak świnki morskiej, szczura i człowieka głównym kationem krwinek czerwonych jest K^+ (17). U zwierząt mogą występować pewne różnice gatunkowe w zawartości Mg^{2+} w erytrocytach i osoczu. I tak, np. u krów rasy czarno-białej stężenie jonów Mg^{2+} w erytrocytach jest 2 razy większe niż w surowicy, a u człowieka 3-5 krotnie wyższe, natomiast u innych przeżuwaczy rozmieszczenie Mg^{2+} po obu stronach błony erytrocytarnej jest prawie jednakowe (7). Gumińska (5) podaje, że istnieje ścisła zależność między zawartością Mg^{2+} w erytrocytach, a stopniem wpływu fluoru na aktywność enzymów. Zwierzęta i człowiek z podwyższonym stężeniem magnezu w krwinkach czerwonych są znacznie odporniejsze, ponieważ jony magnezu mogą wiązać fluorki

i częściowo znosić ich inhibicyjny wpływ (6, 9, 11). Spadek stężenia ATP w erytrocytach *in vivo*, pod wpływem fluorków był uprzednio obserwowany u ludzi zawodowo ekspozowanych na fluorki, jak i u dzieci przewlekle narażonych na działanie związków fluorków (8). Zmiany stężenia nukleotydów adeninowych w erytrocytach są zależne nie tylko od czasu ekspozycji i stopnia emisji związków fluorowych, ale także od ilości podaży magnezu w diecie (5). Stwierdzone w badaniach zmiany w stężeniu ATP i AMP u krów rasy cb są podobne do obserwowanych wcześniej u ludzi (8). Wobec niskiego poziomu AMP w erytrocytach, może dochodzić zgodnie z sugestią Atkinsona (1), do sprzężenia zwrotnego między ATP, AMP i glikolizą. W konsekwencji prowadzi to do regulacji metabolicznej erytrocytów, do nasilenia procesów glikolitycznych i wzrostu syntezy ATP. Ponieważ stężenie AMP i ATP w normalnej komórce jest odwrotnie proporcjonalne, stąd AMP jest efektem dodatnim, a ATP efektem ujemnym procesów metabolicznych (1). Miarą równowagi pomiędzy zużyciem energii zawartej w ATP (poprzez hydrolizę) a produkcją tego związku jest potencjał energetyczny. Analizując zatem zmiany potencjału energetycznego u badanych krów, nie stwierdzono istotnego podwyższenia jego wartości u zwierząt narażonych.

Znany wcześniej z danych piśmiennictwa (5, 6, 11), antagonizm fluorków i magnezu w erytrocytach *in vitro* jako zdolność jonów magnezu do znoszenia zahamowania glikolizy pod wpływem fluorków i podwyższenia stężenia ATP i ADP ma swój udział, jak należy sądzić, u krów rasy cb ekspozowanych na związki fluorków. Przy zwiększonej podaży magnezu dochodzi bowiem do tworzenia kompleksów magnezo-fluoro-fosforanowych i neutralizowania toksycznego wpływu fluorków, co znacząco wpływa na gospodarkę energetyczną erytrocytów (5, 6). Należy zaznaczyć, że u badanych krów nie obserwowano korelacji między poziomem fluorków w surowicy a badanymi parametrami.

Piśmiennictwo

1. Atkinson D. E.: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 1968, 7, 4030-4035.
2. Dziubek T.: Badania i obserwacje własne szkodliwego wpływu fluorków na organizmy żywe na tle współczesnego piśmiennictwa. *Metabolizm fluorków*. PWN, Warszawa-Poznań 1982, 137-141.
3. Grabowska M., Gumińska M.: Wpływ fluorków sodowych na ATP-azy aktywne magnezem z błon erytrocytów. *Folia Med. Cracov.* 1995, 26, 29-33.
4. Gumińska M.: Biochemiczne mechanizmy działania fluorków na żywe organizmy. *Folia Med. Cracov.* 1981, 23, 305-321.
5. Gumińska M., Skowron-Sula M.: Wpływ różnych stężeń jonów magnezowych i fluorków na glikolizę erytrocytów *in vitro*. *Folia Med. Cracov.* 1985, 26, 35-41.
6. Gumińska M.: Influence of fluorides on energy metabolism *in vitro* and *in vivo* and related biological effects. *Metab. Fluorine*. Szczecin 1994, 9-11.
7. Hłyńczak A. J.: Metabolizm energetyczny, niektóre właściwości fizykochemiczne i struktura krwinek czerwonych różnych kręgowców. *Biul. WAM* 1970, 9, 1-161.
8. Hłyńczak A. J., Kośmider K., Adamowicz A., Fokt M., Giebas K., Urbańska A.: Energetic erythrocyte pathways in persons exposed to the action of fluoride compounds according to age and length of service. *Biul. Inst. Med. Morsk.* 1980, 31, 61-67.
9. Hłyńczak A. J., Adamowicz A., Fabisz L., Kośmider K., Suska M., Wnuczynski K., Woźniak Z.: Zachowanie się wapnia i magnezu w surowicy ludzi narażonych na działanie związków fluorków w zależności od wieku i stażu pracy. *Med. Pracy* 1980, 31, 345-349.
10. Józwiak Z.: Udział nukleotydów adeninowych w regulacji struktury i właściwości erytrocytów. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1985, 35, 116-132.
11. 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.
12. Korkmaz O.: *In vitro* effects of sodium fluoride and sodium dichromate on dynamic properties of human erythrocyte membrane. *Biophys. Chem.* 2000, 83, 111-120.
13. Krook L., Maylin G. A.: Industrial fluoride pollution: chronic fluoride poisoning in Cornwall island cattle. *Fluoride* 1981, 14, 97-100.
14. Machoy Z.: Biochemiczne mechanizmy działania związków fluorków. *Folia Med. Cracov.* 1987, 28, 61-81.
15. Machoy Z., Dąbkowska E., Samujło, Ogoński T., Raczyński J., Gębczyńska Z.: Relationship between fluoride content in bones and the age in European elk (*Alces alces L.*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1995, IIIC, 1, 117-120.
16. London R. E., Gabel S. A.: Fluorine-19 MNR studies of glucosyl fluoride transport in human erythrocytes. *Biophys. J.* 1995, 69, 1814-1818.
17. Marut A.: Prosta fotometryczna metoda oznaczania stężenia fluorków w surowicy krwi i moczu. *Diagn. Lab.* 1978, 14, 253-262.
18. Moriya F., Hashimoto Y., Kuo T. L.: Pitfalls when determining tissue distributions of organophosphorus chemicals: sodium fluoride accelerates chemical degradation. *J. Anal. Toxicol.* 1999, 23, 210-215.
19. Morris M. B., Monteith G., Ronfogalis 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. Biochem.* 1982, 48, 356-366.
20. Pieróg B., Socha M.: Pozytywne i negatywne oddziaływanie fluorków na organizm człowieka. Źródła fluorków w środowisku. *Med. Pracy* 2000, LI, 75-78.
21. Schmidt E.: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Chemie, Mannheim 1974.
22. Spencer H. C.: Experiences with fluorosis in cattle. *JAVMA* 1977, 170, 36-38.
23. Wakselman C.: Fluorinated organic compounds: synthesis and biological applications. *Ann. Pharm Fr.* 1999, 57, 108-115.
24. Yamamoto G., Yoshitake K., Sato T., Kimura T., Ando T.: Distribution and forms of fluorine in whole blood of human male. *Anal. Biochem.* 1989, 182, 371-376.
25. Zgierski A., Gondko R.: *Obliczenia biochemiczne*. PWN, Warszawa 1981.

Adres autora: dr Maria Suska, ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin

BEGARA-MCGORUM I., CLARK A. M., MARTIN S., JEFFERY M.: Częstość występowania zmian wodniczkowych typowych dla scrapie w mózgu zdrowych wybrakowanych owiec na Sze-tlandach. (Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands). *Vet. Rec.* 147, 439-441, 2000 (16).

Scrapie (zakaźna gąbczasta encefalopatia owiec i kóz) charakteryzuje się wakuolizacją neuronów i neuropili ośrodkowego układu nerwowego, astrocytozą, martwicą neuronów oraz obecnością białka prionowego (PrP). Zmiany w mózgu pojawiają się we wczesnych stadiach choroby jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych. W celu określenia częstości występowania tego typu zmian przebadano w latach 1998-1999 histopatologicznie mózgi 1106 klinicznie zdrowych owiec z 28 stad zakażonych scrapie i z 9 stad wolnych od tej choroby. W mózgu 1% owiec występowało zwyrodnienie wodniczkowe i było białko prionowe charakterystyczne dla scrapie. Wszystkie te owce posiadały przynajmniej jeden allel genu białka prionowego kodującego walinę w kodonie 136 i pochodziły ze stad, w których w ciągu ostatnich 4 lat występowały kliniczne przypadki scrapie. Najczęściej i najbardziej zaawansowane zmiany występowały w jądrze parasympatycznym nerwu błędnego. Istnieje przypuszczenie, że do zakażenia dochodzi za pośrednictwem włókien wstępujących nerwu błędnego.