

Wpływ morfiny i skopolaminy na zawartość glutationu i aktywność enzymów glutationowych w tkankach myszy

GRAŻYNA ŚWIDERSKA-KOŁACZ, BARBARA PARKA, ADAM KOŁATAJ*, JOLANTA KLUSEK

Instytut Biologii Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Akademii Świętokrzyskiej, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce

*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska

Świdarska-Kołacz G., Parka B., Kołataj A., Klusek J.

Influence of morphine and scopolamine on glutathione contents and activity of glutathione enzymes in mouse organs

Summary

The aim of the study was to determine the influence of morphine and scopolamine on the glutathione level and activity of glutathione enzymes in the liver, kidney and muscles.

The study was carried out on 30 male and 30 female 8-week-old mice weighing 20-22g. All individuals were placed in standard cages, had constant access to water and standard food (16% of protein in diet). The experimental groups received morphine (20 mg/kg b.w.) and scopolamine (0.5 mg/kg b.w.). The level of reduced glutathione, the activity of glutathione transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase were determined in the liver, kidney and muscles.

The alkaloids decreased the GSH level and the activity of glutathione peroxidase. The activity of glutathione transferase increased while the activity of glutathione reductase increased insignificantly. Sex had no influence on the animals' reactivity.

Keywords: glutathione, mice, morphine, scopolamine

Jednym z biochemicznych wskaźników przemian metabolicznych są wielofunkcyjne grupy tiolowe pochodzące w komórkach zwierzęcych głównie od glutationu (5, 36). Dzięki grupie tiolowej glutation uczestniczy w reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych i z tego, między innymi, powodu występuje w formie zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG). Wysokie stężenie GSH warunkuje prawidłowe funkcjonowanie komórki (7, 8, 34, 37). Okazało się, że za odpowiednią koncentrację glutationu w komórkach i tkankach odpowiedzialnych jest kilka enzymów, z których najważniejszymi są: peroksydaza glutationowa (E.C.1.11.1.9), transferaza glutationowa (E.C.2.5.1.18) i reduktaza glutationowa (E.C.1.6.4.2) (1, 2, 13, 18-20). Modelowymi alkaloidami wywołującymi szczególne zainteresowanie na polu biochemicznym i farmakologicznym są: morfina i skopolamina (4, 11, 24, 28, 29, 35). Morfina działa silnie hamująco na ośrodkowy układ nerwowy, zwłaszcza na okolicę czuciową kory mózgowej oraz na ośrodki wegetatywne. Jest ona też jednym z najsilniejszych leków przeciwbólowych. Skopolamina natomiast poraża układ przywspółczulny a więc skutki przez nią wywołane są podobne do objawów pobudzenia układu współczulnego. Skopolamina tłumia także aktywność receptorów cholinergicznym. Jednym z podstawowych czynników ochraniających układ nerwowy przed działaniem egzogennych związków

chemicznych jest glutation, który zabezpiecza przede wszystkim przed szkodliwą peroksydacją lipidów.

Celem badań było określenie wpływu morfiny i skopolaminy na poziom glutationu i aktywność enzymów glutationowych w wątrobie, nerce i mięśniach myszy jako zwierząt modelowych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 8-tygodniowych 30 samcach i 30 samicach myszy szczepu Swiss o masie ciała około 23 ± 2 g. Zwierzęta pochodziły z hodowli Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Wszystkie osobniki umieszczone były w specjalistycznych plastikowych klatkach ze stałym dostępem do wody i paszy granulowanej zawierającej 16% białka, produkcji Przedsiębiorstwa Wytwórci Pasz „Łomna”, w Łomnej koło Warszawy. Miały one zapewnioną dobrą opiekę weterynaryjną i przebywały w pomieszczeniu fermi o temperaturze 21°C przy naturalnym oświetleniu dnia i nocy.

Myszy podzielono na 3 grupy, w tym jedną kontrolną i dwie doświadczalne. W obrębie każdej grupy wydzielono podgrupy samic i samców, liczące po 10 osobników. Poddawane były one określonym zabiegom, według następującego schematu: grupa I – kontrolna – zwierzęta otrzymujące 0,9% roztwór NaCl, grupa II – zwierzęta otrzymujące morfinę, 20 mg/kg masy ciała, grupa III – zwierzęta otrzymujące skopolaminę, 0,5 mg/kg masy ciała.

Roztwory soli fizjologicznej i alkalo- idów podawane były zwierzętom do- otrzewnowo w ilości 100 μ l jeden raz dziennie, stale o godzinie 9⁰⁰ w okresie 7 dni. 24 godziny po ostatniej iniekcji zwierzęta zabijano przez przerwanie rdzenia kręgowego i dekapitację. Bezpo- średnio izolowano wątrobę, nerkę i lewy mięsień udowy. Wątrobę poddawano perfuzji oziębionym do +4°C roztworem soli fizjologicznej w celu usunięcia krwi. Odważone skrawki tkanek homogenizo- wano w szklanym homogenizatorze Pot- tera (z tłokiem teflonowym) w 0,1 M bu- forze fosforanowym o pH 7,4 zawierają- cym 10 mM EDTA. Homogenaty wiro- wano 10 minut przy 12 tysiącach obro- tów/minutę w wirówce typu Janetzki K-24, w temperaturze +4°C.

Oznaczanie glutationu zredukowa- nego przeprowadzono metodą Ellmana (12). Aktywność transferazy glutationo- wej oznaczano metodą Habiga i wsp. (16), aktywność peroksydazy glutationo- wej według metody Chiu i wsp. (9), re- duktaży glutationowej według Szczekli- ka (31). Poziom białka oznaczono meto- dą Lowry'ego i wsp. (26) w modyfikacji Kirschke i Wiederandersa (22).

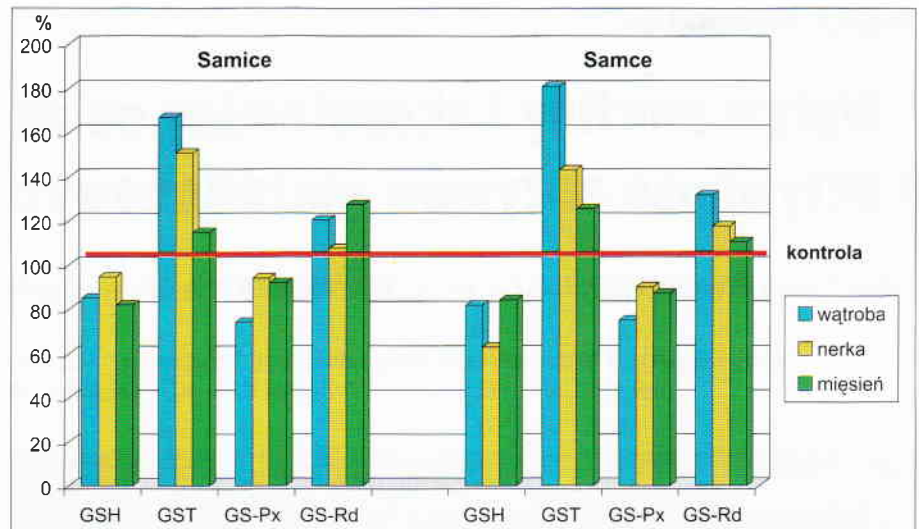
Koncentrację glutationu przedstawi- ono w mM/g świeżej tkanki, a aktywność enzymów w U/mg białka/minutę. Uzys- kane wyniki poddano obliczeniom sta- tystycznym, stosując wieloczynnikową analizę wariancji.

Wyniki i omówienie

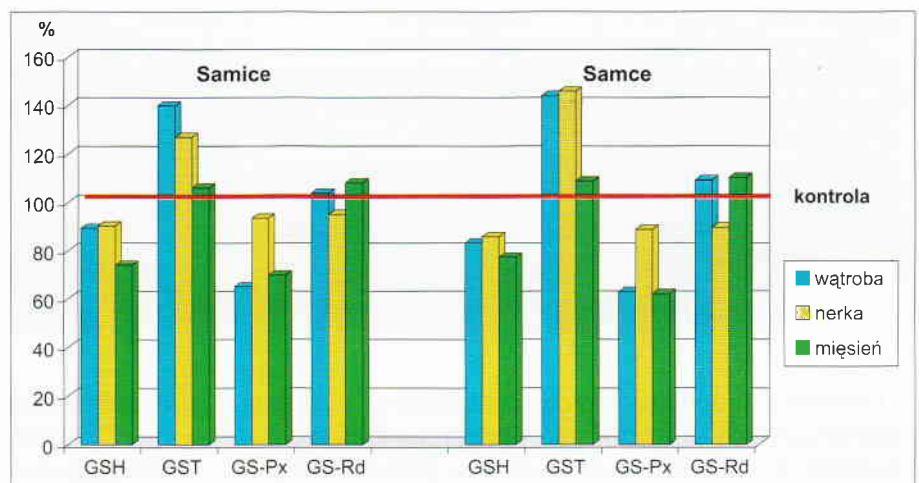
Analiza otrzymanych wyników wy- kazała, że iniekcja użytych w ekspe- rymencie alkaloidów wywołała zmiany koncentracji glutationu i aktywności enzymów glutationowych we wszystkich obserwowanych organach badanych zwie- rząt. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (14, 15, 21, 23, 27). W wyniku przeprowadzonego ekspery- mentu zauważono przede wszystkim, że w warunkach normalnych, tzn. u zwierząt grupy kontrolnej wątroba cha- rakteryzowała się największą koncentracją grup tiolo- wych, nieco niższa była ona w nerce, a najniższa w mięśniu. Dane te potwierdzają wyniki wcześniej- szych obserwacji (25, 32, 33).

W eksperymencie wykazano, że u zwierząt kontrol- nych płeć nie ma istotnego wpływu na koncentrację glutationu i aktywność enzymów glutationowych. Po iniekcji morfiny i skopolaminy stwierdzono jednak, że amplituda wahań koncentracji glutationu i akty- wności enzymów glutationowych była wyższa u sam- ców w porównaniu ze zmianami u samic.

Jak wynika z danych tab. 1 i ryc. 1 i 2, iniekcje alka- loidów powodowały spadek poziomu glutationu zre-



Ryc. 1. Procentowe zmiany koncentracji glutationu (GSH), aktywności transferazy glutationowej (GST), peroksydazy glutationowej (GS-Px) oraz reduktazy glutationowej GS-Rd w badanych tkankach myszy po iniekcji morfiny



Ryc. 2. Procentowe zmiany koncentracji glutationu (GSH), aktywności transferazy glutationowej (GST), peroksydazy glutationowej (GS-Px) oraz reduktazy glutationowej GS-Rd w badanych tkankach myszy po iniekcji skopolaminy

dukowanego we wszystkich badanych organach. Ob- niżenie poziomu GSH w warunkach obciążenia orga- nizmu narkotykami może być spowodowane zwięk- szeniem ogólnej aktywności metabolicznej i wzrastają- cym zapotrzebowaniem na grupy tiolowe, zwięsz- cza w wątrobie, gdzie ich ważna rola w odtruwaniu organizmu jest dawno dowiedziona. Niższa koncen- tracja glutationu po działaniu obserwowanych narko- tyków może być również wywołana zaburzeniami jego biosyntezy. Morfina wywołuje zmiany potencjału redox (6, 10, 14, 15). Konsekwencją stresu oksydacyj- nego jest obniżenie stosunku stężeń GSH/GSSG oraz całkowitego stężenia glutationu w komórkach. Grupa tiolowa glutationu reaguje z wolnymi rodnikami (RFT), a ponadto regeneruje utlenione grupy-SH. Pro- wadzi to w konsekwencji do obniżenia stężenia gluta- tionu zredukowanego (GSH), a podwyższenia koncen- tracji glutationu utlenionego (GSSG) (30).

Obniżenie stężenia glutationu w wątrobie prowadzi do wzmożenia peroksydacji lipidów w następstwie

Tab. 1. Wpływ iniekcji morfiny i skopolaminy na koncentrację glutationu zredukowanego (GSH) (mmol SH/g tkanki) w wybranych organach samic myszy i samców myszy (n = 10; $\bar{x} \pm S_d$)

Grupa	Wątroba		Nerka		Mięsień	
	Samice	Samce	Samice	Samce	Samice	Samce
Kontrola	6,68 ± 0,72	5,83 ± 0,34	3,69 ± 0,18	3,29 ± 0,31	2,77 ± 0,32	2,85 ± 0,42
Morfina	5,68** ± 0,49	4,77** ± 0,43	3,49 ± 0,34	2,07*** ± 0,21	2,27 ± 0,19	2,40 ± 0,21
Skopolamina	5,96** ± 0,31	4,85** ± 0,19	3,33 ± 0,24	2,82** ± 0,21	2,05** ± 0,21	2,20* ± 0,28

Objaśnienia: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001

Tab. 2. Wpływ iniekcji morfiny i skopolaminy na aktywność transferazy glutationowej (GST) (U/mg białka/min.) w wybranych organach samic i samców myszy (n = 10; $\bar{x} \pm S_d$)

Grupa	Wątroba		Nerka		Mięsień	
	Samice	Samce	Samice	Samce	Samice	Samce
Kontrola	4,229 ± 0,293	4,345 ± 0,397	2,642 ± 0,249	2,406 ± 0,332	1,646 ± 0,206	1,455 ± 0,122
Morfina	7,057*** ± 0,341	7,857*** ± 0,433	3,986*** ± 0,262	3,442** ± 0,267	1,889 ± 0,249	1,825 ± 0,258
Skopolamina	5,908*** ± 0,232	6,252*** ± 0,214	3,352** ± 0,160	3,506*** ± 0,282	1,744 ± 0,103	1,582 ± 0,174

Objaśnienia: jak w tab. 1.

Tab. 3. Wpływ iniekcji morfiny i skopolaminy na aktywność peroksydazy glutationowej (GS-Px) (U/mg białka/min.) w wybranych organach samic i samców myszy (n = 10; $\bar{x} \pm S_d$)

Grupa	Wątroba		Nerka		Mięsień	
	Samice	Samce	Samice	Samce	Samice	Samce
Kontrola	0,0441 ± 0,0033	0,0539 ± 0,0053	0,0152 ± 0,0017	0,0276 ± 0,0033	0,0159 ± 0,0024	0,0161 ± 0,0016
Morfina	0,0327** ± 0,0037	0,0404*** ± 0,0018	0,0143 ± 0,002	0,0248*** ± 0,0028	0,0146 ± 0,0018	0,0140 ± 0,0014
Skopolamina	0,0287*** ± 0,0037	0,0339*** ± 0,0035	0,0142 ± 0,0012	0,0245 ± 0,0038	0,0111 ± 0,0020	0,0100* ± 0,0014

Objaśnienia: jak w tab. 1.

Tab. 4. Wpływ iniekcji morfiny i skopolaminy na aktywność reduktazy glutationowej – GS-Rd (U/mg białka/min.) w wybranych organach samic i samców myszy (n = 10; $\bar{x} \pm S_d$)

Grupa	Wątroba		Nerka		Mięsień	
	Samice	Samce	Samice	Samce	Samice	Samce
Kontrola	0,0159 ± 0,0016	0,0142 ± 0,0020	0,0121 ± 0,0024	0,0126 ± 0,0019	0,0062 ± 0,0010	0,0049 ± 0,0010
Morfina	0,0192* ± 0,0027	0,0187** ± 0,0016	0,0130 ± 0,0030	0,0148 ± 0,0010	0,0079 ± 0,0007	0,0054 ± 0,0008
Skopolamina	0,0165 ± 0,0010	0,0155 ± 0,0013	0,0115 ± 0,0011	0,0113 ± 0,0021	0,0067 ± 0,0008	0,0054 ± 0,0006

Objaśnienia: jak w tab. 1.

ekspozycji na ksenobiotyki. Niekorzystne skutki obniżenia stężenia glutationu w komórkach narażonych na stres oksydacyjny wydają się uwarunkowane obniżeniem szybkości istotnych reakcji detoksykacyjnych, co może mieć miejsce w przypadku podawania wymienionych alkaloidów, w których uczestniczy ten związek, a mianowicie reakcji redukcji nadtlenu (katalizowanej przez peroksydazę glutationową) oraz reakcji sprzęgania aldehydów powstających w procesie peroksydacji lipidów (katalizowanej przez transferazy glutationowe) (5).

Ponieważ zredukowany glutation, utrzymywany na odpowiednio wysokim poziomie w komórkach, jest najskuteczniejszym sposobem ochrony przed działaniem wolnych rodników tlenowych, zdolności antyoksydacyjne i naprawcze posiadają więc także jego

enzymy, jak: peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa czy transferaza glutationowa (19).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na istotny wzrost aktywności transferazy glutationowej po iniekcji morfiny i skopolaminy (tab. 1, ryc. 1 i 2)

Enzym ten uważany jest także za jeden z ważniejszych systemów obrony przed toksycznym, a nawet kancerogennym działaniem różnego rodzaju substancji chemicznych. Pierwszym etapem działania takiego systemu jest enzymatyczne przeniesienie przez transferazy glutationowe aktywnej grupy niepożądanego związku, np. kancerogenu na nukleofilową grupę tiolową zredukowanego glutationu w cytoplazmie. Takie koniugaty glutationu usuwane są aktywnie z komórek i ulegają dalszym przekształceniom na drodze enzymatycznej hydrolizy (19). Tak duży wzrost aktyw-

ności GST po iniekcji skopolaminy i morfiny może potwierdzać to, że alkaloidy są rzeczywiście związkami toksycznymi.

Aktywność peroksydazy glutationowej obniżała się pod wpływem iniekcyjnego wprowadzenia alkaloidów. Arthur (2) wykazał, że peroksydaza glutationowa bierze udział w ochronie komórek przed stresem i zabezpiecza organizm przed m.in. peroksydacją lipidów. Husain i wsp. (17) oraz Ashakumary i Vijayammal (3) zauważyli, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych może albo wzrastać, albo spadać po podaniu nikotyny, a jest to uzależnione od rodzaju tkanki.

Morfina powodowała wzrost aktywności reduktazy glutationowej we wszystkich badanych organach, natomiast skopolamina nie zmieniała istotnie jej aktywności (tab. 1, ryc. 1 i 2). Reduktaza glutationowa redukuje utlenioną formę glutationu, której wzrost powyżej normy fizjologicznej jest bardzo szkodliwy. Reduktaza glutationowa współdziała z peroksydazami poprzez regenerowanie donora protonów, niezbędego do funkcjonowania peroksydaz.

W wyniku przeprowadzonych obserwacji okazało się, że zmiany aktywności badanych enzymów glutationowych zależą od rodzaju podawanego alkaloidu. Silniej działającym i wywołującym największe zmiany związkiem była morfina, nieco mniejsze zmiany wywoływała skopolamina.

Piśmiennictwo

- Ando M., Katagiri K., Yamamoto S., Asamura S., Usuda M., Kawahara I., Wakamatsu K.: Effect of hyperthermia on glutathione peroxidase and lipid peroxidative damage in liver. *J. Therm. Biol.* 1994, 19, 177-185.
- Arthur J. R.: The glutathione peroxidase. *Cell Mol. Life Sci.* 2000, 57, 1825-1835.
- Ashakumary L., Vijayammal P. L.: Effect of nicotine on antioxidant defense mechanisms in rats fed a high-fat diet. *Pharmacology* 1996, 52, 153-158.
- Attila L. M., Ahtee L.: Retardation of cerebral dopamine turnover after morphine withdrawal and its enhanced acceleration by acute morphine administration in rats. *Arch. Pharmacol.* 1984, 327, 201-207.
- Bartosz G.: Metabolizm glutationu. *Post. Bioch.* 1993, 39, 32-38.
- Błaszczak J., Kędziora J., Luciak M., Sibińska E., Trznadel K., Pawlicki L.: Effect of morphine and naloxane on oxidative metabolism during eperirenal ischemia and reoperation. *Exp. Nephrol.* 1994, 2, 364-370.
- Bray T. M., Taylor C. G.: Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1993, 71, 746-751.
- Carbonell L. F., Nadal J. A., Llanos M. C., Hernandez I., Nava E., Diaz J.: Depletion of liver glutathione potentiates the oxidative stress and decreases of nitric oxide synthesis in a rat endotoxin shock model. *Crit. Care Med.* 2000, 28, 2002-2006.
- Chiu D. T. Y., Stults F. H., Tappel A. L.: Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 1976, 445, 558-566.
- Di Francesco P., Tavazzi B., Gaziano R., Lazzarino G., Casalino I. A., Di Pierro D., Garaci E.: Differential effects of acute morphine administrations on polymorphonuclear cell metabolism in various mouse strains. *Life Sci.* 1998, 63, 2167-2174.
- El-Ghoneimi A., Deffarges C., Hankard R., Jean-Eudes Y., Jacqz-Aigrain E.: Intravenous morphine analgesia is not effective after bladder surgery in children: results of a randomized double-blind study. *J. Urol.* 2002, 168, 694-697.
- Ellman G. L.: Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 82, 70-77.
- Forgine M. A., Weiss N., Heydriek S., Cap A., Klings E. S., Bierl C., Eberhardt R. T., Farber H. W., Loscalzo J.: Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002, 282, 1255-1261.
- Gaudas L. C., Carr D. B., Maszczyńska I., Marchand J. E., Wurm W. H., Greenblatt D. J., Kream R. M.: Differential effect of central versus parenteral administration of morphine sulfate on regional concentrations of reduced glutathione in rat brain. *Pharmacology* 1997, 54, 92-97.
- Gaudas L. C., Langlade A., Serrie A., Matson W., Milbury P., Thurel C., Sandouk P., Carr D. B.: Acute decreases in cerebrospinal fluid glutathione levels after intracerebroventricular morphine for cancer pain. *Anest. Analg.* 1999, 89, 1209-1215.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B.: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 7130-7139.
- Husain K., Scott B. R., Reddy S. K., Somani S. M.: Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol* 2001, 25, 89-97.
- Jakoby W. B., Habig W. H.: Glutathione transferases. [w:] *Enzymatic Basis of Detoxification*, (red.) Jakoby W. B., Academic Press, New York 1980, 63-94.
- Jaskaa-Stul R.: Polimorfizm enzymów detoksykacyjnych. *Post. Bioch.* 2000, 46, 50-59.
- Jung K., Kehler S., Klotzek S., Becker S., Henke W.: Effect of storage temperature on the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase in rat liver and kidney homogenates. *Enzyme and Protein* 1994, 47, 149-155.
- Kim M. S., Cheong Y. P., So H. S., Lee K. M., Kim T. Y., Oh J., Chung Y. T., Son Y., Kim B. R., Park R.: Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (1-3373 kinase). *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61, 779-786.
- Kirschke H., Wiederunders B.: Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Proteinases. *Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, Wissenschaftliche Beiträge, Halle, Salle* 1984, 11-17.
- Koutsilieri E., Gotz M. E., Sopper S., Sauer U., Demuth M., Meulen V., Riederer P.: Regulation of glutathione and cell toxicity following exposure to neurotropic substances and human immunodeficiency virus-1 in vivo. *J. Neurovirol.* 1997, 3, 42-349.
- Kumar K. B., Karanth K. S.: Scopolamine blocks the effects of swim stress on memory retrieval in rats. *J. Neurol. Transm.* 1996, 103, 1331-1336.
- Liu R., Li B., Flanagan S. W., Oberley L. W., Gozal D., Qiu M.: Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuronal cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *J. Neurochem.* 2002, 80, 488-500.
- Lowry R. W., Rosebrough G. H., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- Macchia I., Palamara A. T., Buc C., Savini P., Ciriolo M., Gaziano R., Di Francesco P.: Increased replication of Sendai virus in morphine-treated epithelial cells: evidence for the involvement of the intracellular levels of glutathione. *Int. J. Immunopharmacol.* 1999, 21, 185-193.
- Means L. W., Edmonds S. M.: Glucose minimally attenuates scopolamine-but not morphine deficits on a water maze alternation task. *J. Neural. Transm.* 1998, 105, 1171-1185.
- Podlewski J., Chwalibogowska-Podlewska A.: Leki współczesnej terapii. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1990, 43-44.
- Sagara Y., Dargusch R., Chambers D., Davis J., Schubert D., Maher P.: Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic Biol. Med.* 1998, 24, 1375-1389.
- Szczeklik E.: *Enzymologia kliniczna*. PZWL 1974, 221-223.
- Świdarska-Kolacz G., Kotątaj A., Klusek J.: The influence of starvation, transport and crowding on the level of thiol groups in pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 1997, 78, 161-166.
- Świdarska-Kolacz G., Kotątaj A., Klusek J.: The effect of the slaughter method, inbred, age and race on the glutathione level in some organs of rabbits. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 2001, 44, 323-327.
- Tanaka K., Miyazaki I., Fujita N., Haque M. E., Asanuma M., Ogawa N.: Molecular mechanism in activation of glutathione system by ropinirole, a selective dopamine D2 agonist. *Neurochem. Res.* 2001, 26, 31-36.
- Wang L., Wang L., Zhang Y., Zhang B., Chen M.: Low dose transdermal scopolamine increases cardiac vagal tone in patients after acute myocardial infarction. *Chin. Med* 2002, 115, 770-772.
- Winiarska K.: Glutation: niezwykle funkcje pospolitego tripeptydu. *Post. Bioch.* 2000, 46, 318-325.
- Wong Y. L., Smith C. V., McMicken H. W., Rogers L. K., Welty S. E.: Mitochondrial thiols status in the liver is altered by exposure to hyperoxia. *Toxicol. Lett.* 2001, 15, 179-193.