

Zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej u szczurów wywołane działaniem etanolu

KRZYSZTOF LUTNICKI, EWA SZPRINGER, ANDRZEJ MARCINIAK

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej im. F. Skubiszewskiego w Lublinie, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin

Lutnicki K., Szpringer E., Marciniak A.

Ethanol evoked oxidation-antioxidation imbalance in rats

Summary

Ethanol administration is able to induce oxidative stress, resulting in the activation of defense mechanisms, but sometimes ROF production is very intensive and disturbs the balance between its generation and antioxidant capacity. The obtained results show that concentrations of CD, HPETE and MDA in plasma after 2hr, 12hr and 24hr post-ethanol administration were significantly higher than in the control group of animals. 50% ethanol administered orally resulted in a significant increase of lipid peroxide levels in plasma with a simultaneous increase in SOD activity throughout the entire 24 hr period of the experiment. Gpx activity was significantly higher during the first 2 hrs following ethanol administration and then decreased to become lower than in the control group at 12 and 24 hrs. TAS in plasma decreased at hr12 and hr24 following ethanol exposure. Ethanol ingestion disturbed the plasma antioxidant system and augmented lipid peroxidation in a time dependent manner. The increased MDA production was strong evidence that lipid peroxidation is the one of main mechanisms of alcoholic tissue damage.

Keywords: ethanol, lipid peroxidation, antioxidant system

Reaktywne formy tlenu (RFT) są związkami bardzo reaktywnymi i odpowiadają za oksydacyjne uszkodzenie struktur tkankowych. Alkohol etylowy jest jednym z czynników indukujących wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) w organizmie, a jego toksyczność zależy, między innymi, od wywołanego stresu oksydacyjnego. Poza tym etanol ma bezpośredni wpływ na aktywację fosfolipazy A2 i A1, zwiększone uwalnianie kwasu arachidonowego (AA) z błon biologicznych i produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w wyniku aktywacji kaskady AA. Niekiedy generowanie RFT jest tak intensywne, że zaburza naturalną równowagę pomiędzy ich produkcją a potencjałem antyoksydacyjnym ustroju. RFT reagują z lipidami błon komórkowych, co prowadzi do powstawania nadtlenków lipidowych, które są metabolizowane do aldehydu malonowego (MDA) i hydroksyalkenali. Peroksydacja lipidów błon komórkowych prowadzi do zaburzeń funkcji komórek i apoptozy (9-11).

Niebezpieczeństwo procesów peroksydacyjnych wynika z mechanizmu łańcuchowego rozprzestrzeniania się reakcji wolnorodnikowych w następujących po sobie fazach: inicjacji, prolongacji, terminacji i reinicjacji (1, 3, 7). Pojawienie się sprzężonych dienów (CD) jest dowodem rozpoczynającego się procesu peroksydacji. Prolongacja polega na dalszych reakcjach rodników alkilowych z tlenem i tworzeniu rodników

nadtlenkowych, które reagują z kwasami tłuszczowymi błon komórkowych, co prowadzi do powstawania hydronadtlenków kwasów tłuszczowych oraz wolnych rodników alkilowych zdolnych do dalszej reakcji. Terminacja procesu wolnorodnikowego polega na rekombinacji wolnych rodników i powstania produktu, który nie jest wolnym rodnikiem. Prowadzi do powstania zmodyfikowanych, uszkodzonych cząsteczek lipidów, ketokwasów i hydroksykwasów oraz związków lipidowo-białkowych. W obecności jonów żelaza i miedzi może zachodzić reakcja reinicjacji, w której z produktów peroksydacji – hydronadtlenków lipidowych – powstają znów rodniki. Sam alkohol etylowy jest zmiataczem rodnika hydroksylowego (3), a produktem tej reakcji jest wysoce toksyczny aldehyd octowy, który może tworzyć addukty z białkami, kwasami nukleinowymi i innymi cząstkami, zaburzając budowę i funkcję komórek (3, 9).

Celem pracy było prześledzenie wpływu alkoholu etylowego podawanego szczurom dożołądkowo na dynamikę zmian w systemie antyoksydacyjnym organizmu i peroksydację lipidów.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 80 szczurach, samcach szczepu Wistar o masie ciała 190-200 g, podzielonych na 4 grupy po 20 sztuk. Doświadczenia przeprowadzono zgod-

nie z wytycznymi Lokalnej Komisji Etycznej ds. badań na zwierzętach przy Akademii Medycznej w Lublinie. Szczury były głodzone przez 24 godziny przed eksperymentem, lecz miały zapewniony wolny dostęp do poidła napełnionych 10% roztworem glukozy w 0,96% NaCl. Poidła odstawił na godzinę przed doświadczeniem. Szczurom podawano stalową sondą dożołądkową 50% roztwór etanolu w dawce 5 ml/kg m.c., który otrzymywano przez rozcieńczenie 96% alkoholu etylowego w 0,96% NaCl lub aplikowano im taką samą ilość płynu fizjologicznego w grupie kontrolnej.

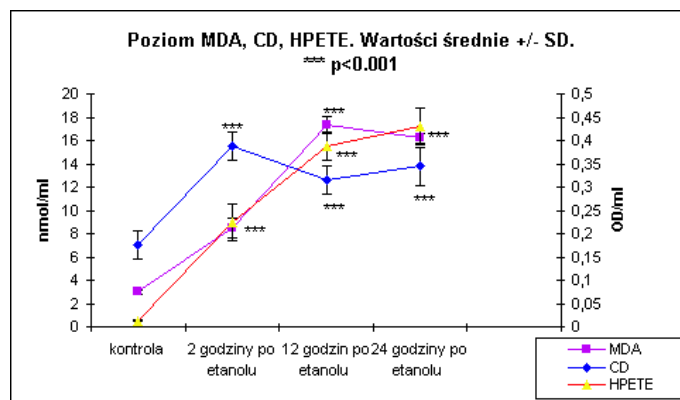
Badano wpływ etanolu na poziom produktów peroksydacji w surowicy, tj.: sprzężonych dienów (CD), hydronadtlenków lipidowych (HPETE) i aldehydu malonowego (MDA) oraz na aktywność enzymatycznych zmiataczy wolnych rodników: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w erytrocytach, peroksydazy glutationu (GPx) we krwi, jak również całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS) w surowicy po 2, 12 i 24 godzinach od podania alkoholu.

CD i HPETE oznaczano według jodometrycznej metody opisanej przez Buege i Augusta (4) w modyfikacji Warda (12). MDA oznaczano metodą Ledwożywa (6). Aktywność SOD w erytrocytach określano przy pomocy zestawu Ransod (Nr kat. SD 125, Randox Lab. Ltd., UK). Aktywność GPx oznaczano przy pomocy zestawu Ransel (Nr kat. RS 505, Randox Lab. Ltd, UK). TAS w surowicy oznaczano zestawem (Nr kat. Nx 2332, Randox Lab. Ltd, UK). Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm odchylenie standardowe SD i poddano analizie statystycznej według testu Anova, wartość $p < 0,001$ przyjęto jako poziom wysokiej istotności.

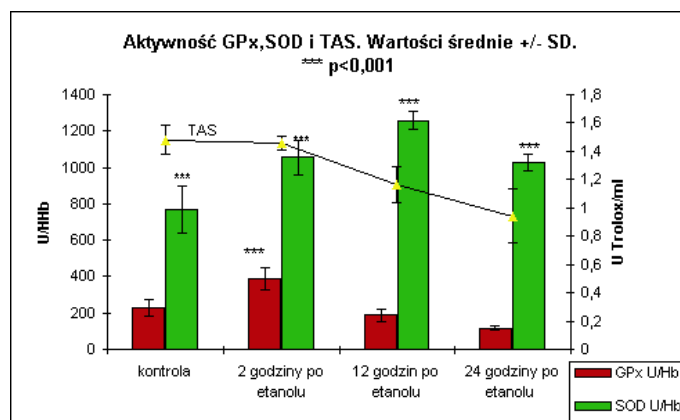
Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki wskazują, że stężenie CD, HPETE i MDA w surowicy po 2, 12, 24 godzinach od podania etanolu były statystycznie istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej (ryc. 1). Co więcej, poziom produktów peroksydacji lipidów był znamienne wyższy po 12 godzinach niż po 2 godzinach po podaniu alkoholu i znamienne wyższy po 24 niż po 12 godzinach od podania etanolu. Aktywność SOD wzrastała w ciągu dwóch godzin po podaniu etanolu, po czym osiągała najwyższą wartość w 12. godzinie i spadała po 24 godzinach, utrzymując się jednak ciągle na poziomie wyższym niż w grupie kontrolnej. Aktywność GPx wzrastała 2 godziny po podaniu alkoholu, a następnie spadała po 12 godzinach, by po 24 godzinach osiągnąć wartość znamienne niższą niż w grupie kontrolnej. Poziom TAS po 2 godzinach od podania etanolu nie zmienił się w sposób istotny w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast po kolejnych 12 i 24 godzinach znamienne spadał (ryc. 2).

Proces peroksydacji rozpoczyna się szybko po podaniu etanolu, czego wyrazem jest gwałtowny wzrost stężenia CD w pierwszych 2 godzinach doświadczenia. W 12. i 24. godzinie dynamika peroksydacji ulega zmniejszeniu, gdyż po 2 godzinach od aplikacji alkoholu włączają się mechanizmy antyoksydacyjne, które jednak nie są w stanie skutecznie zahamować



Ryc. 1. Wpływ etanolu na poziom produktów peroksydacji – MDA w nM/g tkanki, CD w OD 233 nm, HPETE OD 353 nm



Ryc. 2. Wpływ etanolu na aktywność peroksydazy glutationu (GPx) w U/g Hb, dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w U/gHb i całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS) w U Trolox/ml

procesów peroksydacji. Wzrost poziomu MDA obserwowano w swych badaniach Aydin i wsp. (2) w przebiegu chronicznego podawania etanolu.

Wzmocniona aktywność SOD obserwowana od 2. godziny od podania etanolu sugeruje, że zachodzi stały wzrost poziomu anionorodnika tlenowego. Spadek aktywności SOD obserwowany od 12.-24. godziny do wartości wyższych niż w grupie kontrolnej wskazuje, że pierwotne procesy uszkodzenia nadal trwają. Wzrost aktywności GPx związany jest z dezaktywacją nadtlenku wodoru powstałego w reakcjach katalizowanych przez SOD oraz dezaktywacją nadtlenków lipidowych, których stężenie w tym czasie wzrasta. Spadek aktywności GPx jest związany z dostępnością glutationu, którego ilość po spożyciu alkoholu zmniejsza się. Jordao i wsp. (5) donoszą o negatywnym wpływie etanolu na witaminę E, będącą kluczowym czynnikiem nieenzymatycznego układu antyoksydacyjnego oraz na poziom GSH. Mózsik i wsp. (10) obserwowali wzrost aktywności katalazy już po 1 minucie od podania alkoholu, po czym aktywność ta powracała do normy. Enzym ten katalizuje inaktywację nadtlenku wodoru i wraz z GPx ma działanie protekcyjne wobec SOD, chroniąc dysmutazę przed inaktywacją przez nadtlenek wodoru (7). Początek wzrostu aktywności SOD obserwowano już po 15 minutach, zaś aktywność GPx miała ciągłą tendencję wzrostową (10).

Etanol podawany szczurom dożołądkowo zaburza układ antyoksydacyjny i nasila peroksydację lipidów. Spadek aktywności TAS, w skład którego wchodzi tiolet, kwas moczowy, witamina E, bilirubina i lipidy obserwowany od 12 godziny po podaniu alkoholu nasilał się w czasie.

Wzrost produkcji MDA jest dowodem na udział procesu peroksydacji lipidów jako głównego czynnika w mechanizmie alkoholowego uszkodzenia tkanek. Wzrost taki obserwowali Mózsik i wsp. (10) po 30 minutach od podania etanolu. Pierwsze zmiany makroskopowe uszkodzonych komórek śluzówki żołądka pojawiają się już po minucie od podania alkoholu, zaś po godzinie sięgają 50% wszystkich uszkodzeń śluzówki (9, 10). Jest interesującym, że zmiany makroskopowe w uszkodzonych tkankach pojawiają się przed wzrostem poziomu MDA, będącego jednym z wykładników intensywności procesów peroksydacji, co wskazuje na ich udział potencjalizujący działanie czynnika agresywnego w dalszych etapach uszkodzenia struktur tkankowych.

Piśmiennictwo

1. Andrzejak R., Goch J. H., Jurga M.: Wolne rodniki i ich znaczenie w medycynie. Post. Hig. Med. Dośw. 1995, 49, 531-549.

2. Aydin S., Ozaras R., Uzun H., Belce A., Usulu E., Tahan V., Altug T., Dumen E., Senturk H.: N-acetylcysteine reduced the effect of ethanol on antioxidant system in rat plasma and brain tissue. *Tohoku J. Exp. Med.* 2002, 198, 71-77.
3. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa 1995.
4. Buege J. A., August S. D.: Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 1978, 52, 302-310.
5. Jordao A. A., Chiarello P. G., Arantes M. R., Mirelles M. S., Vannucchi H.: Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* 2004, 42, 459-464.
6. Ledwożyw A., Michalak J., Stępień A., Kądziołka A.: The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* 1986, 155, 275-284.
7. Liczmański A. E.: Toksyczność tlenu I, II. *Post. Biochem.* 1988, 34, 273-310.
8. Lutnicki K., Szpringer E., Czerny K., Wróbel J.: The influence of ethanol and different free radical scavengers on lipid peroxidation process and antioxidant status in the rats gastric mucosa. *Annales UMCS, s. D*, 1999, 54, 151-161.
9. Lutnicki K., Szpringer E., Czerny K., Ledwożyw A.: Effects of ethanol and arachidonic acid pathway inhibitors on the effectiveness of gastric mucosa cytoprotection. *Folia Morphol.* 2001, 60, 47-56.
10. Mózsik Gy., Sütö G., Vincze A., Zsoldos T.: *Ulcer disease*. CRC Press Inc. Boca Raton Florida 2000, 15-25.
11. Szpringer E., Lutnicki K.: Current views on apoptosis in theory and medical practice. *P. J. Vet. Sci.* 2003, 6, 71-80.
12. Ward P. A., Till G. O., Hatherill J. R., Annesly T. M., Kunkel R. G.: Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation. *J. Clin. Invest.* 1985, 76, 517-527.

Adres autora: dr n. wet. Krzysztof Lutnicki, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin