

WŁODZIMIERZ TYBURCZYK, JOLANTA BORKOWSKA,  
KRYSTYNA KLIMEK

## BADANIE DYNAMIKI ZMIAN NIEKTÓRYCH PARAMETRÓW BIOCHEMICZNYCH WE KRWI SZCZURÓW ZATRUWANYCH AZOTYNYM SODU

### DYNAMICS OF CHANGES IN SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN BLOOD OF RATS POISONED WITH SODIUM NITRITE

Z Zakładu Biochemii Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. W. Tyburczyk

*Przedstawiono wyniki oznaczeń niektórych parametrów biochemicznych we krwi szczurów po 15, 30, 45, 60, 75 i 90 dniach podawania zwierzętom azotynu sodu.*

Badania wpływu azotanów i azotynów na organizm żywy koncentrują się głównie wokół ostrej toksyczności, co wiąże się z powstawaniem methemoglobinemii [4]. Ostatnie jednak lata przynoszą wzrost zainteresowania fizjologicznymi i biochemicznymi konsekwencjami, wynikającymi z przewlekłego stosowania tych związków w dawkach nie wywołujących jeszcze ostrych objawów zatrucia. Prowadzi to do opracowania zaleceń do działania profilaktycznego i dlatego też istnieje konieczność ustalenia pewnych testów diagnostycznych, pozwalających na określenie stopnia zagrożenia stanu zdrowia ludzi i zwierząt. Takimi testami oprócz methemoglobiny mogą być: witamina E, aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej oraz poziom kwasu 2,3-difosfoglicerynowego [14]. Celem obecnych badań było prześledzenie dynamiki zmian szeregu parametrów biochemicznych we krwi w czasie codziennego podawania azotynu sodu w wodzie do picia w ilości 1 g/dm<sup>3</sup>. Pozwoli to na dokonanie korelacji niektórych uzyskanych zmian z czasem narażenia.

### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia prowadzone były na 72 białych szczurach rasy *Wistar*, samcach o początkowej masie ciała  $208 \pm 20$ . Zwierzęta przebywały przez cały okres badań w pomieszczeniu o stałej temperaturze  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  i karmione były *ad libitum* mieszanką standardową LSM (Bacutil – Warszawa) z dodatkiem marchwi, buraków i kapusty, przy stałym dostępie wody zawierającej azotyn sodu w ilości 1 g/dm<sup>3</sup> przygotowywanej codziennie. Po upływie 15, 30, 45, 60, 75 i 90 dniach zatrucia szczury uśmiercano przez pobranie krwi z serca w słabej narkozie eterowej.

Methemoglobinę [3] oznaczano u szczurów dzień przed zabiciem we krwi pobranej z ogona szczura. We krwi szczurów przeprowadzono następujące oznaczenia: w erytrocytach kwas 2,3-difosfoglicerynowy [2], zawartość białkowych i pozabiałkowych grup – SH [11] oraz aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej [16] i dysmutazy nadtlenkowej [5], a w osoczu poziom witaminy E [9] i hydroksyproliny całkowitej [12]. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stosując test *t-Studenta*

do porównania wartości średnich poszczególnych grup ze średnimi grupy kontrolnej. Za statystycznie zmienną różnicę przyjęto wartość  $P < 0,05$ . Przeprowadzono również dla niektórych parametrów regresję liniową między poziomem lub aktywnością a czasem zatrucia szczurów azotynem sodu.

### WYNIKI

Uzyskane wyniki przeprowadzonych doświadczeń zestawiono w tabeli I, podając wartości średnie oraz odchylenia standardowe.

Poziom methemoglobiny we krwi szczurów otrzymujących azotyn sodu przez 15, 45 i 60 dni zatrucia ulega podwyższeniu. Wszystkie jednak wartości średnie mieszczą się w przyjętej normie fizjologicznej dla szczura. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w erytrocytach zmniejsza się istotnie podczas całego doświadczenia. Istnieje zależność liniowa aktywności tego enzymu i czasu narażenia szczurów na azotyn sodu.

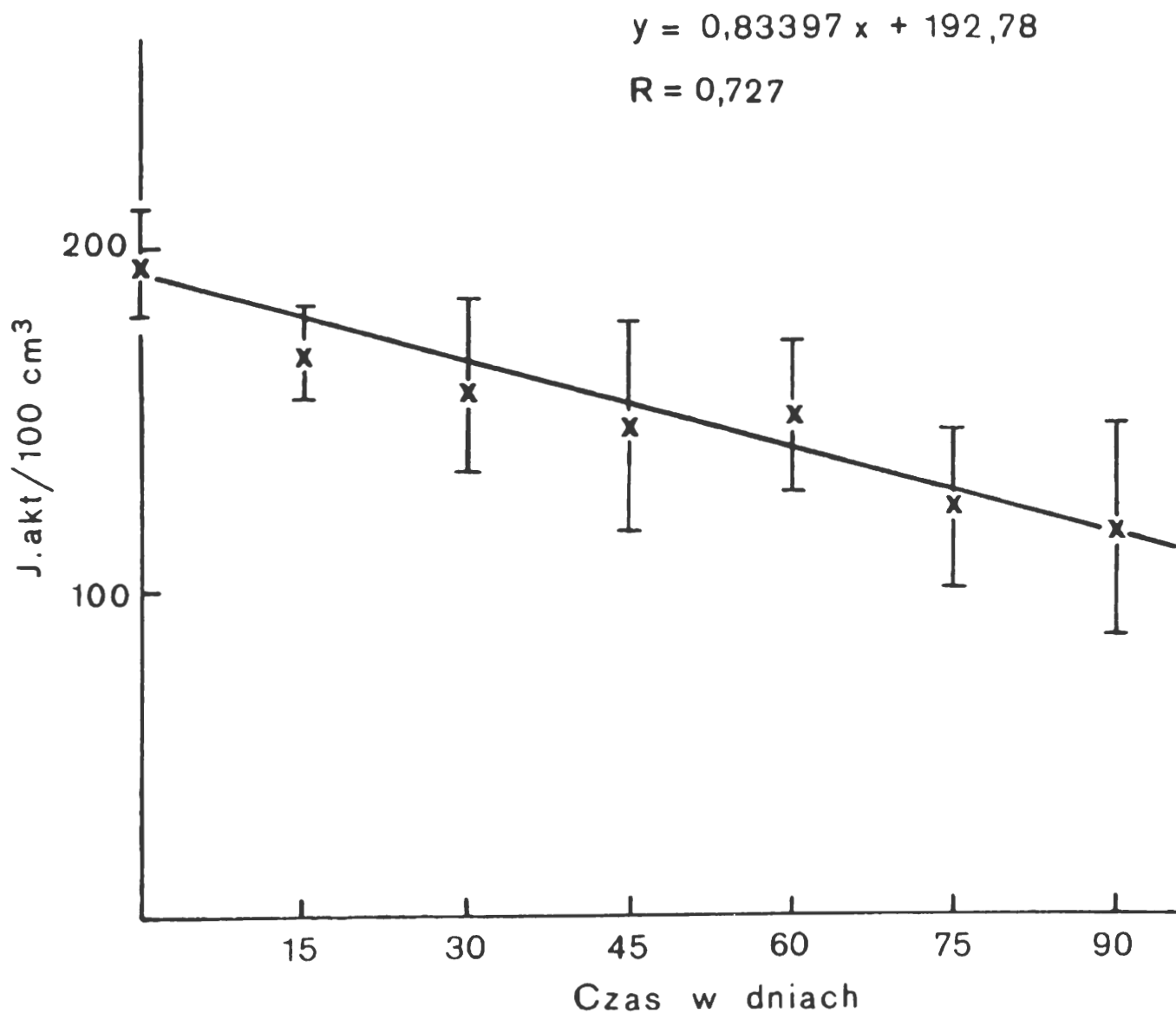
Tabela I. Zmiany niektórych parametrów biochemicznych we krwi szczurów zatruciowych azotynem sodu w dawce  $1\text{g}/\text{dm}^3$  wody do picia, codziennie przez 90 dni  
Changes in some biochemical parameters in blood of rats poisoned daily with sodium nitrite added to drinking water ( $1\text{g}/\text{dm}^3$ ) during 90 days

Oznaczany parametr biochemiczny	Grupa szczurów kontrolnych	Czas podawania szczurom azotynu sodu					
		15 dni	30 dni	45 dni	60 dni	75 dni	90 dni
methemoglobina w % hemoglobiny	0.34 ±0.38	0.98 ** ±1.99	0.03 ±0.14	0.85 ** ±1.27	0.60 * ±0.63	0.09 ±0.16	0.09 ±0.33
aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu w j. akt/100 $\text{cm}^3$	196 ±18	169 *** ±10	159 *** ±29	148 *** ±38	154 *** ±24	127 *** ±26	121 *** ±38
aktywność dysmutazy nadtlenkowej w % utlen. substratu	77.94 ±4.09	65.83 *** ±3.74	61.96 *** ±8.81	76.54 ±3.80	67.50 ** ±6.34	74.60 * ±3.13	76.99 ±4.17
witamina E w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ osocza	12.68 ±1.47	10.56 *** ±1.24	9.43 *** ±1.46	8.13 *** ±1.11	6.58 *** ±1.07	5.04 *** ±0.78	4.45 *** ±0.49
grupy -SH pozabiałkowe w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	2.34 ±0.21	2.17 ±0.13	1.81 *** ±0.15	1.42 *** ±0.22	1.29 *** ±0.20	1.23 *** ±0.24	1.31 *** ±0.34
grupy -SH białkowe w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	51.88 ±2.02	49.40 ** ±2.56	45.35 *** ±2.56	73.20 *** ±3.76	71.27 *** ±6.00	68.58 *** ±4.65	62.31 *** ±2.90
kwas 2, 3-difosfoglicerynowy w $\text{mMol}/\text{cm}^3$	1.22 ±0.15	1.56 * ±0.43	1.93 *** ±0.58	2.02 *** ±0.51	1.96 *** ±0.16	2.13 *** ±0.08	2.21 *** ±0.06
hydroksypolina w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	10.99 ±1.39	—	13.16 ** ±1.74	12.73 * ±1.73	10.97 ±1.60	13.27 *** ±0.98	12.02 * ±0.82

\* - zmiennność  $P < 0.05$ , \*\* - zmiennność  $P < 0.01$ , \*\*\* - zmiennność  $P < 0.001$

Aktywność dysmutazy nadtlenkowej w erytrocytach ulega obniżeniu po 15 i 30 dniach podawania azotynu, a po 45 dniach podnosi się do wartości wyjściowej. Po 60

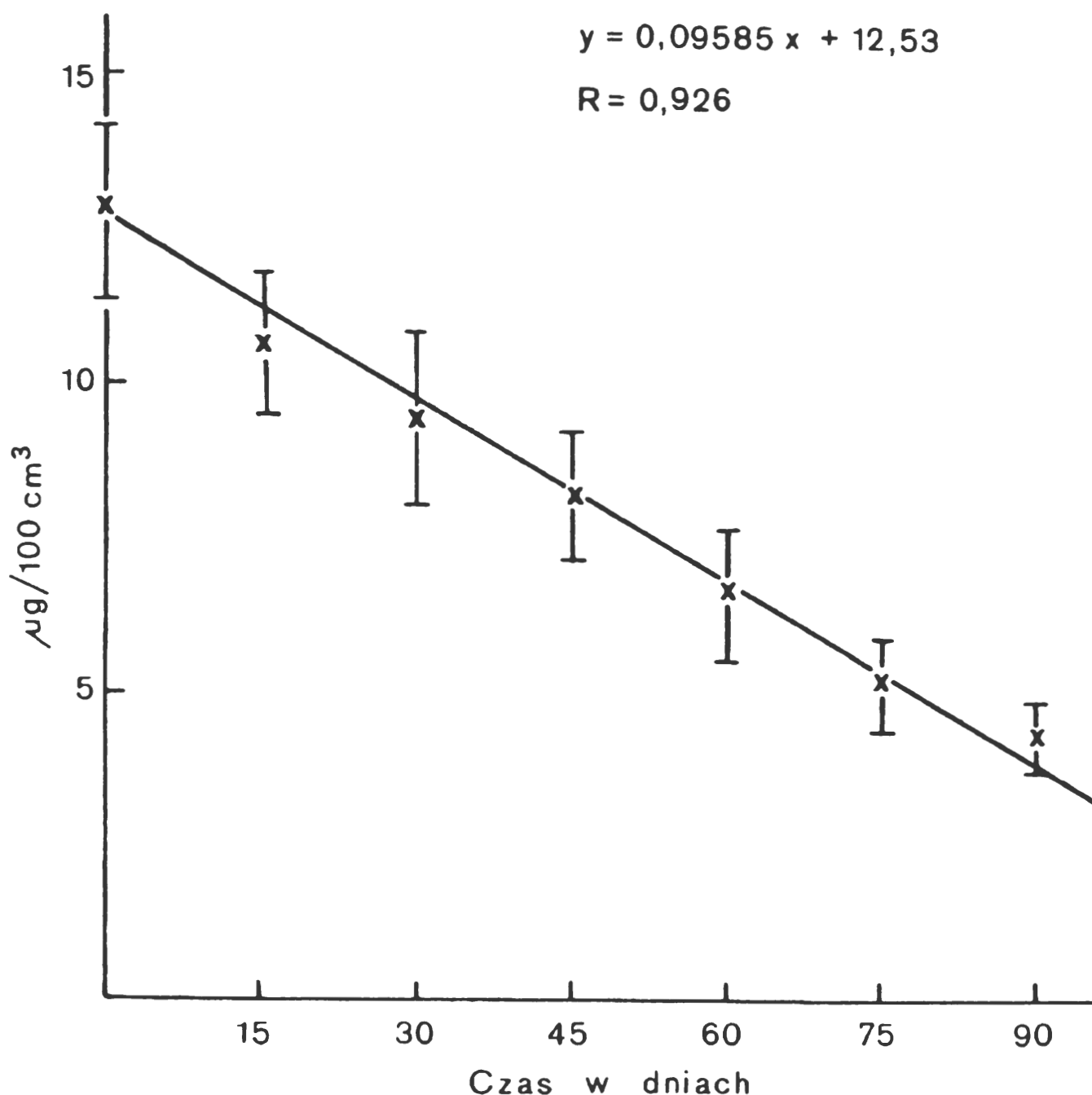
i 75 dniach zatrutowania azotynem sodu aktywność tego enzymu ponownie obniża się, by po 90 dniach osiągnąć powtórnie wartość wyjściową. Poziom witaminy E w osoczu krwi szczurów ulega istotnemu zmniejszeniu. Istnieje przy tym zależność liniowa poziomu tej witaminy i czasu podawania azotynu sodu.



Ryc. 1. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w zależności od czasu narażenia na azotyn sodu

Fig. 1. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in blood as a function of the time of exposure to sodium nitrite

Poziom pozabiałkowych grup tiolowych w erytrocytach począwszy od 30 dnia ulega obniżeniu. Natomiast poziom białkowych grup – SH po 30 dniach spada, a następnie rośnie do końca doświadczenia. Zawartość hydroksyproliny całkowitej w osoczu krwi szczura ulega po 30 i 45 dniach podwyższeniu. Po 60 dniach powraca do stanu wyjściowego, a następnie po 75 i 90 dniach powtórnie wzrasta. Poziom kwasu 2,3-difosfoglicerynowego w erytrocytach rośnie po 15 dniach i utrzymuje się na wyższym poziomie od 90 dnia.



Ryc. 2. Poziom witaminy E w zależności od czasu narażenia na azotyn sodu

Fig. 2. Vitamin E level in plasma as a function of the time of exposure to sodium nitrite

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Podstawowym parametrem biochemicznym świadczącym o toksycznym działaniu azotynów na organizm żywy jest poziom methemoglobiny we krwi. Jednakże maksymalny efekt methemoglobinotwórczy występuje tylko w pierwszych dwóch godzinach od momentu zatrucia [4]. W prowadzonych obecnie badaniach nie stwierdza się u szczurów methemoglobinemii. Podobne zresztą wyniki uzyskano w zatruciach ostrych dużymi dawkami azotynu sodu [14], jak również dawką 10 mg/kg m.c. podawaną codziennie szczurom sondą do żołądka przez 90 dni [15]. W wyniku utleniającego działania azotynu sodu na hemoglobinę powstaje przejściowo rodnik nadtlenkowy  $O_2^-$  [11] o silnym działaniu utleniającym. Drogą usuwania z ustroju tych rodników jest reakcja dysproporcjonowania katalizowana przez dysmutazę nadtlenkową. W prze-

prorowadzonych badaniach obserwuje się przejściowy spadek aktywności tego enzymu. Jednakże dysmutacja rodników nadtlenkowych zachodzi szybko tylko w środowisku kwaśnym a znacznie wolniej w fizjologicznym pH i dlatego część tych rodników dyfunduje z miejsc tworzenia się do innych wewnętrznych struktur komórkowych. Z tych też względów doniosłą rolę odgrywają antyutleniacze takie jak alfa-tokoferol czy glutation. Przejawia się to obniżeniem poziomu witaminy E oraz pozabiałkowych grup tiolowych.

Badania doświadczalne wykonane na szczurach przez *Chow* i wsp. [1] wykazały, że podawany zwierzętom azotyn sodu w ilości 2000 mg/kg paszy przez 14 miesięcy obniżał poziom witaminy E w płazmie o 57%. Podobne wyniki uzyskiwano również w zatruciach ostrych dużymi dawkami azotynu sodu [14] oraz dawką 10 mg/kg m.c. podawaną codziennie przez 90 dni [15].

W wykonanych obecnie doświadczeniach stwierdzono liniową zależność między poziomem witaminy E i czasem narażenia zwierząt. Ponieważ spontaniczna dysmutacja rodników nadtlenkowych dostarcza nadtlenku wodoru, to stwarza możliwość reagowania tych związków ze sobą i tworzenia bardziej toksycznych rodników hydroksylowych. Powodują one peroksydację lipidów z wytworzeniem wolnych rodników lipidowych. Istotną rolę w działaniu wodorotlenków, a w tym i pochodnych lipidowych odgrywa system peroksydazy glutatinowej. System ten może działać tylko przy dostatecznym dostępie zredukowanego glutationu i NADPH. Głównym czynnikiem ograniczającym działanie tego systemu jest aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Niskie stężenia azotynu sodu indukują aktywność tego enzymu, natomiast wysokie stężenia lub długotrwałe działanie niskich stężeń powodują obniżenie jego aktywności [6, 15]. W obecnych badaniach obserwuje się stałe obniżanie się aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w miarę przedłużania czasu narażenia szczurów. Jest to zależność liniowa o czym świadczy wysoki współczynnik korelacji. Również przeprowadzone badania ludzi narażonych na wieloletnią ekspozycję niskich stężeń tlenków azotu emitowanych przez Zakłady Azotowe doprowadza do obniżenia aktywności tego enzymu [8].

W prowadzonych obecnie doświadczeniach obserwowano u szczurów pewne objawy hipoksji. Świadczy o tym wzrost w erytrocytach kwasu 2,3-difosfoglicerynowego już po dwóch tygodniach zatrucia, który utrzymuje się do końca doświadczenia. Hipoksja bowiem powoduje zwiększoną syntezę tego kwasu w krwinkach czerwonych, co ułatwia wykorzystanie rezerwy tlenowej krwi zawartej w tlenie oksyhemoglobiny. Podobne wyniki uzyskali *Mersch* i wsp. [7] podczas ekspozycji świnek morskich na dwutlenek azotu. Przejściowy wzrost poziomu hydroksyproliny w osoczu krwi może być wynikiem zainicjowania przez azotyn sodu procesów związanych z labilizacją błon lizosomalnych oraz zwiększonym katabolizmem tkanki łącznej [10].

#### WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników celowe wydaje się rozważenie wprowadzenia do zestawu badań laboratoryjnych ludzi pracujących w przemyśle azotowym i narażonych na działanie tlenków azotu, azotanów i azotynów, bądź stale przebywających w środowisku przeazotowanym, następujących parametrów biochemicznych: poziomu

methemoglobiny we krwi, aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w erytrocytach oraz poziomu witaminy E w surowicy lub osoczu krwi.

W. Tyburczyk, J. Borkowska, K. Klimek

## DYNAMICS OF CHANGES IN SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN BLOOD OF RATS POISONED WITH SODIUM NITRITE

### Summary

In Wistar rats poisoned by daily addition of sodium nitrite to drinking water (1 g/dm<sup>3</sup>), determination was made of the dynamics of changes in: blood methemoglobin and 2,3-diphosphoglyceric acid levels, contents of protein and non-protein thiol groups in erythrocytes, blood glucose-6-phosphate dehydrogenase and peroxide dismutase activities, as well as plasma vitamin E and hydroxyproline levels. Determinations were performed after 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days of poisoning.

There occurred a linear relationship between the drop in glucose-6-phosphatase dehydrogenase activity and in vitamin E level, on one hand, and the duration of poisoning with sodium nitrite. Moreover, a significant rise of 2,3-diphosphoglyceric acid level in erythrocytes and a decrease in the non-protein thiol groups took place. The results indicated that the determinations – in blood – of: methemoglobin, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes, and vitamin E in plasma or serum, could be included among the diagnostic tests performed (at the laboratories attached to industrial plants or making part of the industrial health service) for evaluation of the health hazard in the nitro-compound industry or in other overnitrified working places.

### PIŚMIENICTWO

1. *Chow C.K., Chen C.J., Gairola C.*: Effect of nitrate and nitrite in drinking water on rats. *Toxicol. Lett.* 1980, 6, 199. – 2. *Dyce B.J., Bessman S.P.*: A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood. *Arch. Environ. Health* 1973, 27, 112. – 3. *Evelyn K.A., Malloy H.T.*: Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulfohemoglobin in single sample of blood. *J. Biol. Chem.* 1938, 126, 655. – 4. *Imaizumi K., Tyuma I., Imai K., Kosaka H., Ueda Y.*: *In vivo* studies on methemoglobin formation by sodium nitrite. *Int. Occup. Environ. Health* 1980, 45, 97. – 5. *Kakkar P., Das B., Visvanathan P.N.*: A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 1984, 21, 130. – 6. *Lesiecki W., Jacyszyn K.*: Działanie metemoglobinotwórcze in vitro związków nitrowych oraz ich równoczesny wpływ na aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej i reduktazy metemoglobiny. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1982, 15, 185. – 7. *Mersch J., Dyce B., Haverback B.J., Sherwin R.P.*: Diphosphoglycerate content of red blood cells. Measurements in guinea pigs exposed to 0,4 ppm nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health* 1983, 38, 94. – 8. *Misiewicz M.*: Zachowanie się zredukowanego glutationu i dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w krwinkach czerwonych ludzi narażonych na zanieczyszczenia emitowane przez zakłady azotowe. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1978, 11, 373. – 9. *Ostrowski J., Hertel Z.*: Oznaczanie tokoferolu w surowicy krwi metodą spektrofluorymetryczną. *Diagn. Lab.* 1977, 13, 163. – 10. *Podolak-Majczak M., Tyburczyk W.*: Wpływ skojarzonego działania azotynu sodu i karbarylu na organizm szczura. cz. IV. Działanie hepatotoksyczne. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1986, 19, 1961. – 11. *Sedlak J., Lindsay R.H.*: Estimation of total, proteinbound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968, 25, 192. – 12. *Tomaszewski J., Hanzlik J.*: Oznaczanie hydroksyproliny w surowicy krwi. *Diagn. Lab.* 1971, 7, 47. – 13. *Tomoda A., Yoneyama*

*Y.*: Mechanism of hemoglobin oxidation by ferricytochrome C and nitrite. *Acta Biol. Med. Germ.* 1981, 40, 943. – 14. *Tyburczyk W., Borkowska J., Podolak M.*: Badania wpływu azotynu sodu na niektóre wskaźniki biochemiczne we krwi szczura. *Roczniki PZH* 1987, 38, 287. – 15. *Tyburczyk W., Borkowska J., Klimek K., Galicki D.*: Wpływ skojarzonego działania azotynu sodu i fenitrotonu na wybrane parametry biochemiczne we krwi szczurów. *Roczniki PZH* 1989, 40, 58. – 16. *Tyśper Z., Karoń H.*: Oznaczanie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w krwinkach czerwonych. *Diagn. Lab.* 1971, 7, 49.–

Lublin, 1990.11.02

20-950 Lublin, ul. Szkolna 16