

EWA SIKORSKA

BADANIA NAD TOKSYCZNOŚCIĄ AMIN BARWNIKOWYCH

III. WPLYW AMIN NA UTLENIONY GLUTATION IN VITRO

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH

Stwierdzono, że ilość utlenionego glutationu we krwi nie ulega podwyższeniu pod wpływem amin, a więc spadek poziomu zredukowanego glutationu wywołany przez te aminy nie jest spowodowany jego przejściem w formę utlenioną.

Przedmiotem tej pracy, podobnie jak części I i II (1, 2) jest zagadnienie hemolizującego działania amin barwnikowych: p-aminofenolu (pAF), p-fenylenodwuaminy (pFDA), p-toluenodwuaminy (pTDA). Aminy te wywołują we krwi zwierząt objawy anemii hemolitycznej (3—6). Mechanizm ich działania hemolizującego jest jednak nieznany. Niedawno stwierdzono, że niektóre związki chemiczne powodują hemolizę poprzez obniżenie poziomu zredukowanego glutationu (GSH) w krwinkach czerwonych (7, 8). Wyniki otrzymane w poprzednich częściach tej pracy wykazały, że aminy obniżają poziom GSH we krwi zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Zjawisko to może być spowodowane albo utlenieniem GSH, albo jego rozpadem do właściwych aminokwasów, względnie dwupeptydów. Zadaniem tej pracy było wykazanie, czy spadek poziomu zredukowanego GSH jest związany z jego przejściem w formę utlenioną.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Metoda oznaczania utlenionego glutationu (G S S G).

Posługiwano się zmodyfikowaną metodą gliksalazową (9). W tej metodzie wykorzystuje się obecność reduktazy GSSG w drożdżach piekarskich. Metoda gliksalazowa jest najbardziej swoistą metodą oznaczania GSH. Opiera się ona na specyfice reakcji enzymatycznych, w których pokrewne związki nie mogą się zastępować. Koenzymem gliksalazy jest GSH, szybkość reakcji katalizowanej przez gliksalazę jest więc zależna od jego stężenia, co pozwala na oznaczenie nieznanymi ilościami GSH wobec krzywej wzorcowej. Gliksalaza katalizuje zmianę metylogliksalu w kwas mlekowy, który można oznaczyć z ilości wydzielonego dwutlenku węgla z NaHCO_3 . Pomiary przeprowadza się w aparacie Warburga. Przy odpowiednio dobranych ilościach enzymu i substratu reakcja przebiega wg schematu stopnia zerowego, tzn. ilość wydzielonego CO_2 jest stała w czasie i wprost proporcjonalna do ilości koenzymu GSH. Źródłem gliksalazy są odpowiednio przygotowane drożdże piekarskie. W drożdżach tych oprócz gliksalazy jest obecna także reduktaza GSSG. Inkubacja roztworu zawierającego GSSG z drożdżami powoduje jego redukcję do GSH. Dodanie po tym do takiej mieszaniny metylogliksalu, substratu gliksa-

lasy, zapoczątkowuje normalną reakcję, która pozwala oznaczyć ilościowo wytworzony przez reduktazę GSH. Upřednia inkubacja badanej próbki z zawiesiną drożdży prowadzi do redukcji zawartego w próbce GSSG i umożliwia oznaczenie całkowitego glutationu: zredukowanego i utlenionego. Równoczesne wykonanie oznaczenia bez inkubacji daje ilość zredukowanego GSH; z różnicy można zatem obliczyć ilość GSSG.

O d c z y n n i k i

Odpowiednio przygotowana zawiesina drożdży piekarskich (10) zawierająca gliksalazę i reduktazę glutationu.

Metylogliksal (MG) otrzymywany z dwuhydroksyacetonu przez destylację z H_2SO_4 wg metody podanej przez Umbreit (11). Ilość MG w destylacie oznaczano metodą Friedemanna (12).

0,8 M $NaHCO_3$.

Mieszanka gazowa do wypełnienia manometrów złożona z 95% N_2 i 5% CO_2 .

Standardy GSH i GSSG przygotowane przez rozpuszczenie 15 mg GSH bądź GSSG w kolbie miarowej obj. 50 ml w 3% kwasie sulfosaliicylowym. Zawartość GSH oznaczano metodą jodanową, a GSSG tą samą metodą po upředniej 20' redukcji metalicznym cynkiem (13). Jako standardów używano objętości zawierające 0,025 i 0,05 mg glutationu.

Wykonanie oznaczenia przeprowadzono wg opisu podanego w I części tej pracy (1). Schemat oznaczenia przedstawia tabela I.

T a b e l a I

Zawartość naczynek przy oznaczaniu całkowitego glutationu

Oznaczenie obejmuje zestaw 12 naczynek składający się każdorazowo z 2 wzorców GSH, 2 wzorców GSSG, ślepej próby dla GSH, ślepej próby dla GSSG i 6 badanych próbek. Wszystkie naczynka zawierają w komorze głównej 0,5 ml standardowej zawiesiny drożdży (DE) i 0,1 ml 0,8 M $NaHCO_3$ oraz inne odczynniki w następującym rozmieszczeniu.

	Odczynniki	Zawartość w ml dla oznaczenia			
		GSH		GSSG	
		ślepa	wzorec lub niezn. próbka	ślepa	wzorec niezn. próbka
Komora główna	0,3% metylogliksal	0,15	0,15	0	0
	GSSG (1 ml = 0,25 mg)	0	0	0	0,1 lub 0,2
	filtrat krwi	0	0	0	0,5
Ramie boczne	0,3% metylogliksal	0	0	0,15	0,15
	GSH (1 ml = 0,25 mg)	0	0,1 lub 0,2	0	0
	filtrat krwi	0	0,5	0	0

Po dodaniu wyżej wymienionych odczynników zawartość naczynek zostaje uzupełniona wodą destylowaną do obj. 2 ml.

Oznaczenia wykonano z 3 standardowymi zawiesinami drożdży (DE I, II, III). Najpierw przeprowadzono badania próbne z każdą serią drożdży. Dla osiągnięcia większej dokładności każdorazowo z analizowanymi płynami robiono po 2 oznaczenia wzorcowe dla GSH i GSSG. Otrzymane wyniki zestawione są w tabeli II.

Tabela II
Średnie ilości wydzielonego CO₂ (μl) po 25' trwania reakcji*
(liczba w nawiasie = ilości oznaczeń)

DE	Ślepa próba		Ilość mg					
			0,0125		0,025		0,05	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG	GSH	GSSG	GSH	GSSG
I	70 ⁽⁹⁾	180 ⁽⁹⁾	69 ⁽³⁾	67 ⁽³⁾	100 ⁽⁹⁾	103 ⁽⁹⁾	170 ⁽⁹⁾	162 ⁽⁹⁾
					110 ⁽²⁾	8 ⁽¹⁾	180 ⁽⁵⁾	12 ⁽³⁾
					KG **)	RB***)	KG	RB
II	61 ⁽⁹⁾	153 ⁽⁹⁾	—	42 ⁽²⁾	75 ⁽⁹⁾	70 ⁽⁹⁾	130 ⁽⁹⁾	121 ⁽⁹⁾
							132 ⁽⁶⁾	KG
III	49 ⁽⁷⁾	108 ⁽⁷⁾	—	—	91 ⁽⁷⁾	88 ⁽⁷⁾	180 ⁽⁷⁾	177 ⁽¹⁾
							203 ⁽⁴⁾	KG

* Układ reagujący: 0,5 ml DE, 0,1 ml 0,8 M NaHCO₃, 0,15 ml 0,3% MG, zmienne ilości GSH i GSSG i zmienne ilości wody uzupełniające mieszaninę do obj. 2 ml.

** Wzorzec znajduje się w komorze głównej (KG).

*** Wzorzec znajduje się w ramieniu bocznym (RB).

Ilość wydzielonego CO₂ w ślepej próbie dla GSSG jest przeciętnie 2,5 razy większa od ilości CO₂ wydzielonego w ślepej próbie dla GSH. Warunki doświadczenia różnią się tylko obecnością MG w mieszaninie reagującej od początku eksperymentu w tej ostatniej próbie. W ślepej próbie dla GSSG MG dodaje się z ramienia bocznego naczynka dopiero przed rozpoczęciem odczytów. Początkowa obecność MG może hamować uboczne reakcje enzymatyczne prowadzące także do wydzielania CO₂, a może także hamować sam system gliksalazowy (14). W tym ostatnim przypadku zachodziłaby w dużo mniejszym zakresie reakcja z resztkami GSH obecnymi w samej zawieszynie drożdży. Ponieważ wiadomo, że MG może chemicznie, bądź enzymatycznie reagować z różnymi tiolami (15), a obecność wolnych grup SH jest konieczna dla działalności wielu enzymów, oba powyższe przypuszczenia są zupełnie możliwe.

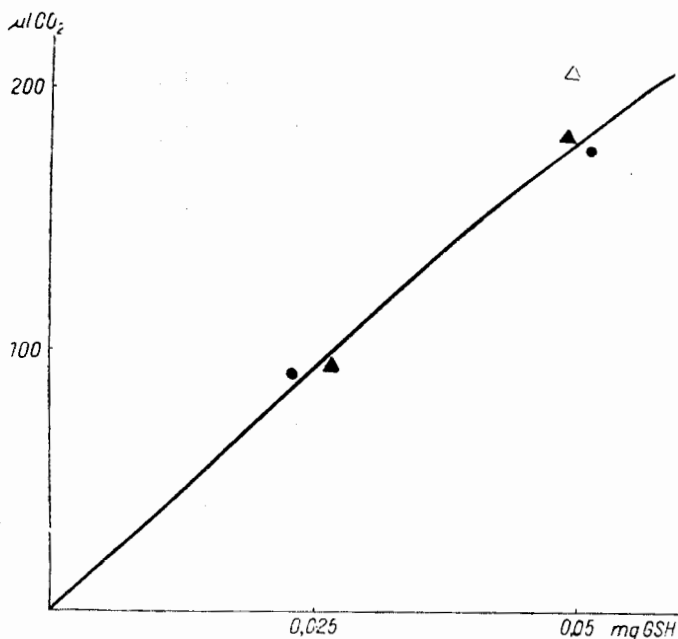
Ilości wydzielonego CO₂ przy jednakowych wzorcach GSH i GSSG są identyczne, świadczy to, że 10' okres inkubacji w temp. 25° w łaźni aparatu Warburga wystarcza do całkowitego zredukowania GSSG.

Ilość wydzielonego CO₂ w przypadku obecności wzorca GSH w komorze głównej naczynka jest nieznacznie większa od ilości CO₂ wydzielonej po dodaniu takiego samego wzorca z ramienia bocznego. Zjawisko to znalazłoby uzasadnienie w razie obecności śladów GSSG w standardzie

GSH, bądź pojawienia się tych śladów w czasie przygotowywania doświadczenia.

Odczyty CO_2 w przypadku dodania wzorcowych ilości GSSG z ramienia bocznego są równe odczytom ślepej próby. Jest to zgodne z zasadą oznaczenia. GSSG dodany do mieszaniny reagującej nie ulega redukcji. Reduktaza GSSG zawarta w zawieszynie DE w obecności MG nie ma już zdolności redukowania GSSG (9), jest to bowiem enzym wrażliwy na odczynniki blokujące grupy SH (16).

Ryc. 1 przedstawia średnią krzywą wzorcową dla III serii drożdży.



Ryc. 1. Krzywa wzorcową GSH.

▲ — GSH początkowo obecny w ramieniu bocznym naczynia. △ — GSH początkowo obecny w komórce głównej naczynia. ● — GSSG początkowo obecny w komórce głównej naczynia.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

Badane aminy używano w postaci chlorowodorków: pAF, HCl, pFDA, 2HCl, pTDA. 2HCl w stężeniu wynoszącym $2 \cdot 10^{-3}$ M.

Doświadczenia przeprowadzono na krwi króliczej pełnej. Krew pobierano z serca do zlewki zawierającej jako antykoagulant mieszaninę szczawianów amonu i potasu w ilościach podanych przez Wintrobe (17). Krew dzielono na 2 części. Jedną stanowiła próbę kontrolną, dodawano do niej 0,9% NaCl w ilości 0,1 ml na 5 ml krwi. Do drugiej dodawano 0,1 ml roztworu chlorowodorku badanej aminy w 0,9% NaCl. Stężenie roztworu aminy dobierano tak, żeby jej końcowe stężenie we krwi wynosiło $2 \cdot 10^{-3}$ M. Po starannym wymieszaniu odpipetowywano po 5 ml krwi do kolbek stożkowych obj. 50 ml, zamykano korkami z waty i wstawiano do cieplarki o temp. 37° . Oznaczenia GSH i GSSG wykonano dla pAF zaraz, po 0,5, 1,0, 1,5 i 3 godz., a dla pFDA i pTDA zaraz, a następnie

po 3 i 24 godz. Czas inkubacji przy pAF był krótszy niż przy pozostałych aminach ze względu na wyjątkowo szybki spadek poziomu GSH przy tej aminie.

Przesącze do oznaczania glutatonu otrzymywano przez odbiałczenie krwi 3% kwasem sulfosalicylowym (na 5 ml krwi 20 ml kwasu). Po dodaniu kwasu mieszano 5', pozostawiano na 30' i sączono. Znaną ilość filtratu (zwykle 0,5 ml) po zobojętnieniu 0,8 M NaHCO₃ pobierano do badań.

W y n i k i

p - a m i n o f e n o l ilość GSH we krwi inkubowanej z pAF ulega szybko zmniejszeniu; otrzymane wartości liczbowe są analogiczne do uzyskanych w I cz. pracy. Natomiast zawartość GSSG nie zmienia się, zaobserwowano jedynie wahania w granicach 6—8 mg⁰/o podobnie jak we krwi kontrolnej (7—9 mg⁰/o). Nawet po całkowitym zaniku GSH ilość GSSG nie zwiększa się. Wartości średnie dla różnych czasów oznaczeń zestawia tabela III.

Tabela III
Zawartość glutatonu w mg⁰/o we krwi króliczej inkubowanej z pAF w temp. 37°
(cyfra przy nawiasie = ilości oznaczeń)

Czas inkubacji	Krew z pAF			Krew kontrolna		
	GSH	GSH całk.	GSSG	GSH	GSH całk.	GSSG
0	39 (39) ²	47 (46—48) ²	8 (7—9) ²	40 (39—41) ²	47 (46—48) ²	7 (7) ²
0,5	25 (18—29) ³	31 (23—33) ⁴	6 (4—6) ⁴	40 (36—42) ⁴	47 (40—51) ⁴	7 (3,3—13) ⁴
1,0	22 (12—27) ⁴	29 (16—35) ⁴	7 (3—11) ⁴	41 (38—45) ⁴	50 (40—60) ⁴	9 (2—15) ⁴
1,5	10	16	6	39 (38—40) ²	46 (42—49) ²	7 (4—9) ²
3,0	0 (0) ³	8 (7—11) ³	8 (7—11) ³	37 (32—41) ³	47 (46—48) ³	9 (7—12) ³

p - f e n y l e n o - d w u a m i n a i p - t o l u e n o d w u a m i n a
Zawartość GSH we krwi króliczej inkubowanej z tymi aminami zmniejsza się i po 24 godz. nie można już wykryć GSH metodą gliksalazową. Ilość GSSG w ciągu 3 godz. nie zmienia się, jest taka sama jak we krwi kontrolnej. Natomiast po 24 godz. GSSG także zanika. Przy pFDA w ogóle go nie znaleziono, a przy pTDA były śladowe ilości (tabela IV i V).

K r e w k o n t r o l n a. Zawartość GSH pozostaje stała w ciągu 3 godz. przechowywania krwi króliczej w cieplarni w temp. 37°. Jednak po 24 godz. inkubacji ilość GSH jest blisko o połowę mniejsza. Ilość GSSG podczas tego całego okresu ulega nieznacznym wahaniom (tabela VI).

Tabela IV

Zawartość glutationu w mg% we krwi króliczej inkubowanej z pFDA w temp. 37°
(cyfra przy nawiasie = ilości oznaczeń)

Czas inkubacji	Krew z pFDA			Krew kontrolna		
	GSH	GSH całk.	GSSG	GSH	GSH całk.	GSSG
0	42 (40-43) ³	48 (46-50) ³	6 (5-7) ³	42 (40-43) ³	48 (45-52) ³	6 (5-9) ³
3	26 (22-30) ⁴	35 (24-41) ⁴	9 (2-12) ⁴	33 (31-39) ⁴	43 (41-56) ⁴	10 (5-15) ⁴
24	0 (0) ³	0 (0) ³	0 (0) ³	22 (20-26) ³	32 (28-35) ³	10 7-1

Tabela V

Zawartość glutationu w mg% we krwi króliczej inkubowanej z pTDA w temp. 37°
(cyfra przy nawiasie = ilości oznaczeń)

Czas inkubacji	Krew z pTDA			Krew kontrolna		
	GSH	GSH całk.	GSSG	GSH	GSH całk.	GSSG
0	35	38	3	42	45	3
3	27 (25-27) ²	31 (30-32) ²	4 (4-5) ²	46 (46) ²	50 (50) ²	4 (4-5) ²
24	0 (0) ³	1 (0-3) ³	1 (0-3) ³	20 (14-24) ³	28 (20-34) ³	8 (6-10) ³

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Otrzymane wyniki wykazują zgodnie, że spadek poziomu GSH we krwi króliczej inkubowanej z badanymi aminami nie jest związany z jego przejściem w formę utlenioną. Rezultaty te nie pokrywają się z podobnymi badaniami *Beutlera* (18) nad acetylofenylohydrazyną, które wykazały, że początkowo następuje podwyższenie ilości GSSG, a dopiero potem spadek całkowitego glutationu. W moich oznaczeniach tego momentu nie udało się uchwycić. Wyników *Beutlera* nie potwierdził także *Flanagan* (19). W doświadczeniach przeprowadzonych *in vivo* z primąquiną dowiódł on, że zawartość GSSG we krwi nie zmienia się, a więc spadek poziomu GSH także i w tym przypadku nie był wywołany konwersją GSH do GSSG. Są zatem trzy możliwości: 1) albo aminy prowadzą do rozpadu GSH, 2) albo powodują jego przejście w formę utlenioną, która natychmiast ulega rozpadowi, 3) albo też są zdolne do wytworzenia trwałego połączenia z GSH. Możliwość istnienia takich połączeń sugerują prace prowadzone przez *Combes* i in. (20) nad sulfobromoftaleiną, udowodniono w nich chromatograficznie istnienie trwałego połączenia między badanym związkami a GSH przez grupę SH cysteiny.

Tabela VI
Zawartość glutationu w mg^o/_o we krwi króliczej inkubowanej w cieplarni w temp. 37° (cyfra przy nawiasie = il. oznaczeń)

Czas inkubacji	GSH	GSH całk.	GSSG
0	41 (39-43) ⁵	48 (45-52) ⁵	7 (5-9) ⁵
0,5	40 (36-42) ⁴	47 (40-51) ⁴	7 (3,5-13) ⁴
1,0	41 (38-45) ⁴	50 (40-60) ⁴	9 (2-15) ⁴
1,5	39 (38-40) ²	46 (42-49) ²	7 (4-9) ²
3,0	42 (31-46) ⁹	47 (41-56) ⁹	8 (4-15) ⁹
24,0	21 (14-26) ⁶	30 (20-35) ⁶	9 (6-15) ⁶

Badania poziomu GSSG we krwi kontrolnej wykazały, że ilość GSSG nie ulega większym zmianom podczas 24 godz. przechowywania w cieplarni w temp. 37°. W tym czasie ilość GSH spada prawie do połowy. Można tu brać pod uwagę tylko dwie możliwości, albo bezpośredni rozpad GSH, albo pośredni poprzez chwilowo tylko istniejącą formę utlenioną.

Ilości GSH i GSSG, znalezione we krwi króliczej, są zbliżone do wartości podawanych przez innych badaczy (21, 22), wynoszą one średnio dla GSH — 40 mg^o/_o, a dla GSSG 8 mg^o/_o.

WNIOSKI

1. Poziom GSSG we krwi króliczej podczas 24 godzinowego przechowywania w cieplarni w temp. 37° ulega tylko nieznacznym wahaniom, po tym samym czasie poziom GSH spada prawie do połowy.

2. Nie wydaje się, żeby badane aminy pAF, pFDA, pTDA obniżały poziom GSH we krwi króliczej na skutek przeprowadzenia go w formę utlenioną.

Э. Сикорска

ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ АМИНОВ КРАСИТЕЛЕЙ

III. Влияние аминов на окисленный глутатион

Содержание

Исследовано уровень окисленного глутатиона (GSSG) в крови кролика, которая подвергалась инкубации в температуре 37° с р-аминофенолом, р-фенилендиаминном

и р-толуолдиамином в продолжении 24 часов. Окисленный глутатин обозначали по глиоксалазовому методу по модификации Martin'a и H. McIlwain'a. Канстатировано, что уровень окисленного GSSG при влиянии аминов не увеличивается, а снижение уровня восстановленного глутатиона аминами не был причиной явления перемены восстановленного глутатина в окисленную форму.

E. S i k o r s k a

STUDIES ON THE TOXICITY OF DYE AMINES

III. The effect of the amines on the oxidized glutathione in vitro

Summary

The level of oxidized glutathione (GSSG) in rabbit blood was determined before and after 24 hours incubation at 37°C of the blood with p-aminophenol, p-phenylenediamine and p-toylenediamine Glyoxalase method as modified by Martin and McIlwain was used for GSSG determination. It was found that the level of GSSG did not increase during incubation. Thus, the decrease in reduced glutathione (GSH) induced by dye amines is not balanced with any increase in GSSG level.

PIŚMIENICTWO

1. Sikorska E.: Roczniki PZH, 10, 245, 1959. — 2. Sikorska E.: Roczniki PZH, 12, 21, 1961. — 3. Łazarew W.: Wrednyje wieszczestwa w promyszlennosti cz. I — Leningrad 1954. — 4. Neureiter F. V., Pietrusky F., Schütt E.: Handwörterbuch der gerichtlichen Medizin und naturwissenschaftlichen Kriminalistik. Berlin 1940. — 5. Nikoronow M.: Acta Pol. Pharmac., 7, 23, 1950. — 6. Stahl K. E., Jung F.: Arch. exp. Path. Pharmacol., 220, 503, 1953. — 7. Dern R. J., Flanagan C. L., Alving A. S.: J. Lab. Clin. Med., 45, 286, 1955. — 8. Davson J. P., Thayer W. T., Desforges J. F.: Blood, 13, 1113, 1958. — 9. Martin H., McIlwain H.: Biochem. J., 71, 275, 1959. — 10. Albert R., Büchner E., Rapp R.: Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 35, 2376, 1902.
11. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.: Manometric techniques and tissue-metabolism., Minneapolis 1951. — 12. Friedemann T. E.: J. Biol. Chem., 73, 331, 1927. — 13. Woodward G. E., Fry E. G.: J. Biol. Chem., 97, 465, 1932. — 14. Klebanoff S. J.: Biochem. J., 64, 425, 1956. — 15. Cliffe E. E., Waley S. G.: Biochem. J., 73, 25 P, 1959. — 16. Asnis R. E.: J. Biol. Chem., 213, 177, 1955. — 17. Wintrobe M. M.: Clinical Hematology, Philadelphia 1946. — 18. Beutler E., Robson M., Buttenwieser E.: J. Clin. Invest., 36, 617, 1957. — 19. Flanagan L. C., Schrier S. L., Carson P. E., Alving A. S.: J. Lab. Med., 51, 600, 1958. — 20. Combes B., Stakelum G. S.: J. Clin. Invest., 39, 978, 1960.
21. Barnes M. M., James S. P., Wood P. B.: Biochem. J., 71, 680, 1959. — 22. Bhattacharya S. K., Robson I. S., Stewart C. P.: Biochem. J., 60, 696, 1955.

Przyjęto do druku: 17.III.1961.