

KRYSTYNA JELENIEWICZ

WPLYW OSTREGO ZATRUCIA SZCZURÓW KARBARYLEM NA REAKCJE TRANSAMINACJI Z UDZIAŁEM PIROGRONIANU

CZ. III. BADANIA UZUPEŁNIAJĄCE AMINOTRANSFERAZ OSOCZOWYCH

Z Katedry i Zakładu Chemii Toksykologicznej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. S. Szczepaniak

Po jednorazowym podaniu szczurom karbarylu w dawce $1/2 LD_{50}$ zbadano aktywność aminotransferaz nie występujących w osoczu krwi w warunkach fizjologicznych, katalizujących reakcje między pirogronianem i sześcioma aminokwasami—donorami grupy aminowej. Stwierdzono, że insektycyd powoduje przechodzenie do osocza pięciu aminotransferaz.

Praca niniejsza stanowi uzupełnienie wcześniej wykonanych badań [3, 4] dotyczących wpływu karbarylu na procesy transaminacji z udziałem pirogronianu. We frakcji cytoplazmatycznej homogenatów wątroby szczura wykazano aktywność aminotransferaz katalizujących reakcje między pirogronianem i ośmioma wybranymi aminokwasami zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i po podaniu karbarylu w dawce $1/2 LD_{50}$ [5]. Natomiast w osoczu krwi szczura zbadano (w grupach doświadczalnych) wpływ insektycydu tylko na te enzymy, które katalizują procesy transaminacji z udziałem argininy i leucyny [4]. Pozostałe aminotransferazy nie zostały w tych badaniach uwzględnione, ponieważ w osoczu w warunkach fizjologicznych (w grupie kontrolnej) nie stwierdzono ich aktywności. Biorąc jednak pod uwagę fakt wzrostu aktywności prawie wszystkich aminotransferaz wątrobowych u szczurów otrzymujących karbaryl [5], podjęto badania mające na celu sprawdzenie czy związek nie powoduje pojawienia się tych enzymów w osoczu.

W przedstawionej pracy zbadano w osoczu szczura aktywność aminotransferaz biorących udział w reakcjach transaminacji z udziałem pirogronianu i sześcioma donorami grup aminowych w różnych okresach po podaniu karbarylu w dawce $1/2 LD_{50}$.

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań użyto 108 szczurów, samców rasy Wistar o średniej masie ciała 256 g. Badania aktywności enzymów transaminujących w osoczu wykonano po 2, 4, 24 i 72 h od podania insektycydu. Szczury, podzielone na 4 grupy doświadczalne po 27 zwierząt w każdej, otrzymywały *per os* jednorazową dawkę karbarylu 474 mg/kg ($1/2 LD_{50}$). Warunki eksperymentu opisano w pierwszej części pracy [4].

Do reakcji transaminacji użyto 6 aminokwasów: asparaginę, kwas glutaminowy, izoleucynę, lizynę i walinę. Równolegle przygotowywano 8 mieszanin reagujących: 2 próby kontrolne i 6 prób z poszczególnymi donorami grup aminowych, dlatego też w celu uzyskania 8 cm³ osocza, łączono przygotowywane jak poprzednio [4] osocze pochodzące od 3 szczurów. Praktycznie więc każdej grupie doświadczalnej wykonywano 9 oznaczeń, lecz ostateczne wyniki są średnią z 27 szczurów.

Ilości poszczególnych reagentów dodawanych do mieszanin inkubacyjnych zawierających 1 cm³ osocza, temperatura i czas wykonania reakcji transaminacji, a także dalszy tok postępowania z mieszaninami reagującymi w celu przygotowania roztworów do analizy chromatograficznej i metodykę ilościowych oznaczeń alaniny opisano poprzednio [4].

Wyniki oznaczeń ilościowych opracowano statystycznie testem *t-Studenta*, aby sprawdzić, które z enzymów transaminujących nie wykazujących aktywności w warunkach fizjologicznych (grupa kontrolna) pojawiają się w osoczu i są aktywne po podaniu karbarylu.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Rezultaty oznaczeń alaniny endogennej (pochodzącej z puli aminokwasów osocza) i alaniny powstającej w wyniku reakcji transaminacji w różnych okresach po podaniu karbarylu zestawiono w tabeli I, podając wartości średnie, przedziały ufności i istotność różnic. Tabela uwzględnia również grupę zwierząt kontrolnych, przebadanych poprzednio [4].

Tabela I. Średnie stężenia alaniny endogennej i tworzącej się w wyniku reakcji transaminacji w osoczu krwi szczurów kontrolnych i po jednorazowym podaniu karbarylu w dawce 1/2 LD₅₀ (μmol/cm³/h)

Donor grupy aminowej	Alanina endogenna N = 9	Kontrola N = 11	Okres intoksykacji			
			2 h N = 9	4 h N = 9	24 h N = 9	72 h N = 9
ASP-NH ₂	0,41±0,05	0,03±0,02	0,03±0,01	0,01±0,005	0,02±0,008	0,16±0,05*
ASP	dla wszystkich sześciu aminokwasów	0,09±0,03	0,06±0,02	0,07±0,02	0,12±0,06	0,21±0,02*
GLU		0,14±0,06	0,12±0,05	0,29±0,03*	0,11±0,05	0,10±0,05
ILEU		0,05±0,03	0,09±0,05	0,07±0,05	0,15±0,02*	0,53±0,05*
LIZ		0,04±0,02	0,03±0,01	0,05±0,02	0,07±0,05	0,06±0,02
WAL		0,05±0,05	0,03±0,02	0,07±0,02	0,08±0,05	0,12±0,05**

ASP-NH₂ — asparagina, ASP—kwas asparaginowy, GLU—kwas glutaminowy, ILEU—izoleucyna, LIZ—lizyna, WAL—walina.

N — liczebność.

Znamienność statystyczna różnic: * — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$

Analiza statystyczna wyników wykazała, że w wyniku ostrego zatrucia szczurów karbarylem dawką 1/2 LD₅₀ pojawiały się w osoczu enzymy transaminujące, katalizujące reakcje między pirogronianem i pięcioma spośród sześciu przebadanych aminokwasów — dawców grup aminowych. Po 4 h po podaniu karbarylu wykazano aktywność aminotransferazy katalizującej reakcję z udziałem kwasu glutaminowego, a po upływie 24 h — z udziałem izoleucyny.

W 24 h po podaniu karbarylu nie stwierdzono aktywności enzymu katalizującego reakcje między pirogronianem i kwasem glutaminowym ($p > 0,05$), natomiast aktywność aminotransferazy katalizującej reakcję z udziałem izoleucyny wzrosła znacznie w 72 h od podania karbarylu. W tym czasie w osoczu wykazano aktywność również innych aminotransferaz. We wszystkich badanych terminach nie obserwowano wpływu karbarylu na aktywność enzymu katalizującego reakcję między pirogronianem i lizyną. Wcześniejsze badania wykazały, że aktywność tego

enzymu we frakcji cytoplazmatycznej homogenatów wątroby utrzymywała się w granicach poziomu fizjologicznego przez cały okres eksperymentu.

Ponadto w ostrym zatruciu szczurów karbarylem wykazano wzrost aktywności pozostałych enzymów transaminujących we frakcji rozpuszczalnej homogenatu wątrobowego — największy w 24 i 72 h intoksykacji. Najwcześniej, bo już w 2 h narażenia wzrosła aktywność aminotransferaz katalizujących reakcje z udziałem kwasu glutaminowego i leucyny, przy czym aktywność enzymu biorącego udział w pierwszej z wymienionych reakcji powracała do normy już po 4 h. W osoczu krwi szczurów otrzymujących karbaryl enzym ten pojawiał się najwcześniej, już po 4 h i znikał z krwiobiegu po dłuższym czasie narażenia. Inne badane enzymy transaminujące wykazywały aktywność w osoczu po 72 h, a aminotransferaza katalizująca reakcję między piroglutianem i izoleucyną — również po 24 h, tj. w czasie, kiedy stwierdzano ich wzmoczony udział w procesach transaminacji w homogenatach wątroby. Dotyczy to reakcji, w których udział biorą następujące aminokwasy: kwas asparaginowy, izoleucyna i walina. Zależność ta nie występowała w przypadku wcześniej przebadanych donorów grup aminowych, a mianowicie leucyny i argininy [4].

Rezultaty przeprowadzonych badań zdają się świadczyć o tym, że pojawienie się niektórych aminotransferaz w osoczu w wyniku ostrego zatrucia szczurów karbarylem, jest odzwierciedleniem aktywności tych enzymów we frakcji cytoplazmatycznej homogenatów wątroby. Wiadomo bowiem, że enzymy frakcji rozpuszczalnej najłatwiej przenikają z komórki i najczęściej spotyka się je we krwi w stanach patologicznych. Niezależnie od tego, czy wzrost aktywności danego enzymu w wątrobie jest zjawiskiem pierwotnym, czy wtórnym, powinien on znaleźć swe odbicie w jego poziomie w surowicy [15]. Zmiany aktywności enzymów w surowicy stwierdza się jednak później niż w wątrobie. Można przypuszczać, że wzrost aktywności niektórych z przebadanych aminotransferaz we frakcji cytoplazmatycznej homogenatu wątroby szczura doprowadził do pojawienia się tych enzymów w osoczu.

Przechodzenie enzymów z tkanek do surowicy w wyniku działania substancji toksycznych może być spowodowane różnymi przyczynami. Jedną z nich są zmiany metabolizmu komórki, nawet jeśli są one niewielkie i mają charakter przejściowy [15]. Wzrost enzymów komórkowych w surowicy może być spowodowany również przez zmiany czynnościowe w przepuszczalności błony komórkowej, przy czym jedne z enzymów mogą przedostawać się do krwiobiegu w mniejszej, a niektóre w większej ilości. Zmiany komórkowe nie zawsze są wynikiem bezpośredniego działania substancji toksycznej na komórkę [2, 8]. W warunkach zmienionej przepuszczalności błony komórkowej skład enzymatyczny surowicy nie musi odpowiadać składowi enzymatycznemu danego narządu. W warunkach fizjologicznych również nie stwierdza się korelacji między ilością danego enzymu w tkance a jego poziomem w surowicy [15].

Do uwalniania się enzymów z komórki nie jest konieczny jej rozpad, ponieważ subtelne nawet uszkodzenie powodować może nieprawidłowe przenikanie enzymów [15]. Tylko w niektórych przypadkach przechodzenia enzymów z komórek narządowych do krwiobiegu można tłumaczyć tworzeniem się ognisk martwiczych. Wykazano bowiem, że niekiedy

zwiększanie się aktywności enzymów w surowicy może wyprzedzać tworzenie się martwicy komórkowej [2, 7].

Bardzo ważną przyczyną przechodzenia enzymów do płynu pozakomórkowego i surowicy jest niedotlenienie i związane z nim zaburzenia gospodarki energetycznej. Na zmiany w zachowaniu się enzymów może również wpływać adaptacja enzymatyczna [15].

Zmiany aktywności enzymów pod wpływem czynników szkodliwych (hamowanie bądź pobudzanie) świadczą o nieprawidłowości biochemicznych procesów ustrojowych. Aktywność wielu enzymów może być wykładnikiem procesów metabolicznych zachodzących w organizmie [14]. Substancje hepatotoksyczne mogą wywierać bezpośredni wpływ na błony plazmatyczne i błony komórkowe wątroby, a efektem wtórnym jest dezorganizacja metabolizmu hepatocytów. Szereg hepatotoksyn wywołuje uszkodzenie wątroby przez selektywną interferencję w procesach metabolicznych hepatocytów. Te zakłócenia w funkcjonowaniu podstawowych szlaków metabolicznych komórek wątrobowych prowadzą z kolei do wystąpienia zmian strukturalnych w błonie komórkowej i organelach hepatocytów, przy czym zmiany te mają charakter wtórny [3].

Jak wykazały badania *Urbanek-Karłowskiej* [14], nie ma pojedynczego testu enzymatycznego wskazującego na uszkodzenie wątroby. W ocenie toksykologicznej przydatność oznaczeń enzymatycznych wykonywanych w surowicy krwi jest mniejsza niż w wątrobie, zwłaszcza przy długotrwałym narażeniu na małe dawki substancji toksycznych.

Dane literaturowe dowodzą, że karbaryl zarówno w dużych, jak i w małych dawkach powoduje zmiany strukturalne, morfologiczne i histopatologiczne w narządach, a głównie w wątrobie. Wykazano, że związek uszkadza tkankę wątrobową zwiększając przepuszczalność błon komórkowych dla substancji endogennych, w tym i enzymów [6, 7, 10, 11, 12, 13]. Hepatotoksyczne działanie karbarylu ujawniające się rozwojem zmian martwiczych i destrukcyjnych prowadzi do szeregu funkcjonalnych i morfologicznych zaburzeń i dotyczy także funkcji wydzielniczej i katabolicznej wątroby [9, 13].

Wyniki niniejszej pracy oraz wcześniej wykonanych badań [4, 5] mogą sugerować również wpływ ostrego zatrucia karbarylem na mechanizmy przepuszczalności błon komórkowych i plazmatycznych hepatocytów, w wyniku czego dochodzi do przechodzenia niektórych aminotransferaz do osocza. Przyczyną przechodzenia enzymów transaminujących do krwi może być również niedotlenienie, bowiem w badaniach na królikach dowiedziono, że karbaryl powoduje hipoksję, która charakteryzowała się głównie wzrostem stężenia tlenu we krwi żyłnej i zmniejszeniem współczynnika wykorzystania tlenu przez tkanki [1].

WNIOSKI

1. W wyniku ostrego zatrucia szczurów karbarylem pojawiają się się w osoczu enzymy transaminujące reakcje między pirogronianem i pięcioma aminokwasami (oprócz lizyny).

2. Najwcześniej, bo już w 4. h intoksykacji wykazano aktywność aminotransferazy, katalizującej reakcję z udziałem kwasu glutaminowego.

3. Najwyższa aktywność badanych aminotransferaz w osoczu występowała po 72 h od podania karbarylu.

К. Еленевич

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ КРЫС КАРБАРИЛОМ НА РЕАКЦИИ ТРАНСАМИНИРОВАНИЯ С УЧАСТИЕМ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

Ч. III. Дополнительные исследования аминотрансфераз плазмы

Резюме

Белые крысы породы *Wistar* (сажты) отравляно per os однократной дозой карбарила 474 мг/кг ($1/2 DL_{50}$). После 2, 4, 24 и 72 ч. с времени введения инсектицида обозначено в плазме крови активность аминотрансфераз катализирующих реакции между пировиноградной кислотой и следующими аминокислотами: аспаргином, аспариновой кислотой, глутаминовой кислотой, изолейцином, лизином и валином.

В физиологических условиях эти аминокислоты не участвовали в реакциях трансаминирования.

Активность аминотрансфераз изображено количеством аланина, который создается в течение инкубации 1 мл плазмы в течение 1 часа. Аланин обозначено спектрофотометрически после хроматографического разделения на бумаге.

Статистическая оценка результатов исследований показала, что после острой интоксикации карбарилем в плазме крови экспериментальных животных появляются почти все исследуемые аминотрансферазы (за исключением фермента катализирующего реакцию между пировиноградной кислотой и лизином). После 4 ч. с момента введения инсектицида отметили активность фермента трансаминирующего реакцию с участием глутаминовой кислоты, а после 24 и 72 ч. — с участием изолейцина. В 72-ом ч. интоксикации обнаружено тоже активность аминотрансфераз катализирующих реакции между пировиноградной кислотой и следующими аминокислотами: аспаргином, аспариновой кислотой и валином.

K. Jeleniewicz

THE EFFECT OF ACUTE POISONING OF RATS WITH CARBARYL ON THE TRANSAMINATION REACTIONS WITH THE PARTICIPATION OF PYRUVATE

Part III. Supplementary studies of the plasma aminotransferases

Summary

Male *Wistar* rats were poisoned orally with one carbaryl dose 474 mg/kg ($1/2 DL_{50}$). After 2, 4, 24 and 72 hours from the administration of the insecticide the activity of plasma aminotransferases catalysing the reactions between pyruvate and the following amino acids: asparagine, aspartic acid, glutamic acid, isoleucine, lysine and valine was determined.

Under physiological conditions these amino acids are not participating in the transamination reactions.

The activity of aminotransferases was expressed as the amount of alanine developing during incubation of 1 ml of plasma for 1 hour. Alanine was determined spectrophotometrically after chromatographic separation on paper.

The results of the investigations demonstrated that acute poisoning with carbaryl caused the appearance of activity of all studied plasma aminotransferases, except for the enzyme catalysing the reaction between pyruvate and lysine. The activity of the studied aminotransferases appeared as follows: glutamic acid — pyruvate — 4 hr; isoleucine — pyruvate — 24 and 72 hr; asparagine — pyruvate, aspartic acid — pyruvate and valine — pyruvate — 72 hr after intoxication.

PIŚMIENICTWO

1. Bieleńko G. A., Subbotina S. B.: Dychatielnaja funkcija krowi pri wozdiejstwie sewina, Woprosy gigeny truda, professionalnoj patologii i promyslennoj toksikologii. Sbornik trudow, 1970, 12, 211. — 2. Hanke J.: Wartość diagnostyczna określania aktywności enzymów surowicy w zatruciach ostrych. Med. Pracy 1967,

- 18, 60. — 3. Hanke J., Lutz W.: Biochemia, toksykologia i diagnostyka laboratoryjna wątroby. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1986, 108. — 4. Jeleniewicz K., Szczepaniak S.: Wpływ ostrego zatrucia szczurów karbarylem na reakcje transaminacji z udziałem pirogronianu. Cz. I. Aktywność aminotransferaz osoczowych. Roczn. PZH, 1987, 38, 429. — 5. Jeleniewicz K., Szczepaniak S.: Wpływ ostrego zatrucia szczurów karbarylem na reakcje transaminacji z udziałem pirogronianu. Cz. II. Aktywność aminotransferaz wątrobowych. Roczn. PZH, 1988, 39, 232. — 6. Jordan M., Srebro Z., Pierścińska E., Woźny L.: Preliminary observations on the effects on the organs of mice of administering some carbamate pesticides. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1975, 14, 205. — 7. Kagan J. S., Rodionow G. A., Woronina Ł. J., Wieliczko Ł. S., Kulagin O. M., Pieremitina A. D.: Wlijanije sewina na funkcjonalnoje sostajanie i strukturu pieczeni. Farmakol. Toksikol. 1970, 33, 219. — 8. Krawczyński J.: Próby enzymatyczne jako wskaźniki uszkodzenia narządu, komórki i organelli komórkowych. Diagn. Lab. 1969, 5, 241. — 9. Onikienko F. A.: Aktywnost niekatorych fiernientow krwi i pieczeni żiwotnych pri ostroj i chroniczeskoj intoksikacji sewinom. Farmakol. Toksikol. 1972, 35, 237. — 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, 161. — 11. Pokrowskij A., Nienow P.: Wlijanije sewina na fiernientnyje konstielacji krwi i tkaniej ciepłokrotnych żiwotnych. Wopr. Pit. 1968, 27, 55. — 12. Rybakowa M. N.: O toksiczekom diejstwii sewina na żiwotnyj organizm. Gig. Sanit. 1966, 9, 42. — 13. Szaflarska-Stojko E.: Badania patomorfotyczne nad toksycznością i patomechanizmem lindanu, karbarylu i gamakarbatoxu — pestycydami produkcji krajowej. Med. Pracy 1976, 27, 235. — 14. Urbanek-Karłowska B.: Aktywność wybranych enzymów jako wskaźnik szkodliwego działania w toksykologii doświadczalnej. Rozprawa habilitacyjna, PZH Warszawa, 1980, 72. — 15. Wehler H.: O mechanizmie zmian poziomu enzymów w surowicy krwi. Post. Biochem. 1964, 10, 405.

Dnia 1989.01.18.

20-080 Lublin, ul. Dymitrowa 5.