

Mateusz Labudda

## HEPATOTOKSYCZNOŚĆ OŁOWIU – WYBRANE ASPEKTY PATOBIOCHEMII

LEAD HEPATOTOXICITY: SELECTED ASPECTS OF PATHOBIOCHEMISTRY

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie / Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Warszawa, Poland  
Katedra Biochemii / Department of Biochemistry

### STRESZCZENIE

Ołów (Pb) zaliczany do metali ciężkich jest jednym z ważniejszych składników zanieczyszczających środowisko. Ekspozycja zawodowa i środowiskowa na ołów może prowadzić do wchłaniania jego związków do organizmu i toksycznego oddziaływania na wątrobę. W artykule przedstawiono poglądy dotyczące biochemicznych uwarunkowań hepatotoksycznego działania ołowiu. Zwrócono uwagę na wytwarzanie reaktywnych form tlenu, zaburzenia w komórkowym systemie antyoksydacyjnym, peroksydację lipidów, inhibicję białek enzymatycznych i transdukcję sygnału między komórkami. Med. Pr. 2013;64(4):565–568

**Słowa kluczowe:** hepatotoksyczność, metale ciężkie, ołów

### ABSTRACT

Lead (Pb) that belongs to heavy metals is one of the major pollution components of the environment. Occupational and environmental exposure to lead can cause its absorption by the body and consequently exert toxic effects in the liver. In this paper biochemical determinants of hepatotoxicity caused by lead are presented. Generation of reactive oxygen species, disturbances in the cellular antioxidant system, lipid peroxidation, inhibition of enzymatic proteins and intercellular signaling are also discussed. Med Pr 2013;64(4):565–568

**Key words:** hepatotoxicity, heavy metals, lead

Autor do korespondencji / Corresponding author: Mateusz Labudda, Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, e-mail: mateusz\_labudda@sggw.pl  
Nadesłano: 5 lipca 2013, zatwierdzono: 23 lipca 2013

## WSTĘP

Metale ciężkie to pierwiastki chemiczne o właściwościach toksycznych, których nadmiar w organizmie człowieka i zwierząt może skutkować wieloma różnymi biochemicznymi, fizjologicznymi i behawioralnymi zaburzeniami (1). Chemiczne związki ołowiu (Pb) pełniąc istotną rolę w nowoczesnym przemyśle, stały się wszechobecnymi środowiskowymi substancjami toksycznymi (2). Zarówno ekspozycja zawodowa, jak i środowiskowa na te związki stanowi poważny problem w rozwiniętych i rozwijających się krajach (3) oraz może nieść za sobą wiele zaburzeń w funkcjonowaniu wątroby (4), nerek (4–6), mózgowia (7,8), układu immunologicznego (9–12) i erytrocytów (13,14).

## BIOCHEMICZNE MECHANIZMY TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA NA WĄTROBĘ

W ostatnich latach coraz szerzej w literaturze specjalistycznej podejmowane są zagadnienia związane z zaburzeniem homeostazy między generowaniem reaktywnych

form tlenu (reactive oxygen species – ROS) a wydolnością enzymatycznego i nieenzymatycznego układu antyoksydacyjnego organizmu człowieka i zwierząt. Stan, w którym komórki ekspozowane są na wysokie stężenia ROS, przyjęło określać się stresem oksydacyjnym. Wiadomo, że większość wdychanego tlenu ulega w komórkach biochemicznym przemianom z wytworzeniem nukleotydu adeninowego – ATP (adenozynotrifosforanu), wielofunkcyjnego koenzymu i molekularnego nośnika energii chemicznej użytecznej w metabolizmie komórkowym. Tylko niewielka jego część (ok. 3–5%) ulega redukcji, wskutek czego powstają ROS, m.in. anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ) i rodnik hydroksylowy ( $OH^{\bullet}$ ).

W badaniach doświadczalnych dowiedziono, że w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego ołowiem systemy antyoksydacyjne hepatocytów nie są w stanie nadążyć z naprawą peroksydacyjnie modyfikowanych lipidów błonowych. W związku z tym stres oksydacyjny uważany jest za jedną z przyczyn uszkodzenia błon komórek miększu wątroby w przebiegu zatrucia ołowiem. Co więcej, procesy peroksydacji lipidów finalnie prowadzą do zmian we właściwościach

fizykochemicznych błon hepatocytów i utraty ich integralności (15–17). Stężenie reaktywnych form tlenu w hepatocytach może wzrastać nie tylko wskutek ich wzmożonej produkcji, ale również jako konsekwencja zaburzenia ich wymiatania, wywołanego dysfunkcją systemu obrony antyoksydacyjnej.

Ekspozycja na ołów obniża aktywność wątrobowych enzymów antyoksydacyjnych – katalazy, która katalizuje przekształcenie  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i tlenu cząsteczkowego, oraz dysmutazy ponadtlenkowej, katalizującej reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego. W hepatocytach pod wpływem ołowiu obserwowane jest również zmniejszenie poziomu zredukowanego glutationu (reduced glutathione – GSH), który jako najważniejszy komórkowy bufor tiolowy jest istotnym składnikiem systemu antyoksydacyjnego. Równocześnie inhibicji ulegają enzymy glutationowego szlaku redukcji form nadtlenkowych w komórce, a więc peroksydaza glutationowa (katalizująca reakcję GSH z  $H_2O_2$ ) oraz reduktaza glutationowa (odtworząca pulę zredukowanego glutationu) (17).

Jak już wspomniano, peroksydacja lipidów błon komórkowych prowadzi do spadku ich integralności, wskutek czego ulega naruszeniu fizjologiczna struktura tkanek wątroby. Wyraźnie dostrzegalne jest to w analizach biochemicznych surowicy krwi, w której odnotowuje się wzrost aktywności enzymów biomarkerów uszkodzenia wątroby – aminotransferazy alaninowej (alanine transaminase – ALT), aminotransferazy asparaginianowej (aspartate transaminase – AST) i fosfatazy alkalicznej (18). W modelowych doświadczeniach na szczurach narażonych na ołów stwierdzono, że poziom ALT w surowicy jest istotnie wyższy niż poziom AST, co w dużej mierze może wskazywać na uszkodzenie mięszu wątroby (2,19,20).

W komórkach wątroby umiejscowione są liczne enzymy, które biorą udział w metabolizmie trucizn. Biotransformację ksenobiotyków można opisać jako trój etapowy ciąg reakcji biochemicznych. W reakcjach I fazy katalizowanych przez wątrobowe oksydoreduktazy i hydrolazy dochodzi do tworzenia związków pośrednich w procesach utleniania, redukcji i hydrolizy. W reakcjach II fazy przy udziale głównie hepatocytarnych transferaz następuje tworzenie produktów, które sprzęgane są z metabolitami ustrojowymi – glutationem, aminokwasami oraz kwasem octowym i siarkowym, a przede wszystkim glukuronowym. Ponadto wysoką aktywność monooksygenaz (np. CYP 3A4) wchodzących w skład I fazy biotransformacji obserwuje się w komórkach nabłonkowych jelita cienkiego (enterocytach).

Jednocześnie w tych komórkach na wysokim poziomie utrzymywana jest aktywność ATP-zależnej P-glikoproteinowej pompy antyportowej (P-gp). Pompa zwrotnie transportując część ksenobiotyków z wnętrza enterocytów do światła jelita cienkiego, zapewnia bardziej efektywną transformację pozostałej części ksenobiotyków przez monooksygenazy. W następstwie tego znacząco spada ilość substancji toksycznych doprowadzanych żyłą wrotną do wątroby. Co więcej, obecność glikoproteiny P w hepatocytach oraz apikalnych powierzchniach kanalików żółciowych umożliwia aktywny transport metabolitów II fazy biotransformacji do żółci.

W ostatnich latach antyportowe procesy transportu przez błony komórkowe przy udziale m.in. glikoproteiny P włączono do ogólnoustrojowego systemu detoksykacji ksenobiotyków, nadając im nazwę III fazy detoksykacji. W badaniach doświadczalnych na szczurach dowiedziono, że ekspozycja na ołów powoduje spadek aktywności enzymów cytochromu P450, które są kluczowym ogniwem w reakcjach I fazy. Zaobserwowano, że zarówno nieorganiczne (21), jak i organiczne (22) związki ołowiu ograniczają aktywność tej grupy białek enzymatycznych. Ponadto enzymy katalizujące II etap unieszkodliwiania ksenobiotyków również ulegają inhibicji. Stwierdzono spadek aktywności S-transferazy glutationowej przy jednoczesnym zmniejszeniu poziomu GSH (23–25).

Toksyczny wpływ jonów ołowiu na wątrobę obejmuje również zaburzenia w transdukcji sygnału między komórkami. Zmiany te zostały potwierdzone w przypadku interakcji komórek siateczkowo-śródbłonkowych wątroby (zwanymi dawniej komórkami Kupffera lub komórkami Browicza-Kupffera) a hepatocytami. Stwierdzono, że ekspozycja na ołów w obecności niskiego poziomu lipopolisacharydu synergistycznie pobudza wzrost intensywności sygnalizacji między komórkami Kupffera a hepatocytami. Badacze wskazują, że biochemiczny sygnał wysyłany z komórek Kupffera w postaci plejotropowej cytokiny prozapalnej, jaką jest czynnik martwicy nowotworów typu  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ) indukuje proteolityczną śmierć hepatocytów. Przyciąga on i aktywuje neutrofile (granulocyty obojętnochłonne), które wydzielając m.in. proteazy serynowe, zabijają hepatocyty (26).

Uszkodzenia hepatocytarnych błon plazmatycznych potwierdzono, wykorzystując test cytotoxycywności, którego miarą jest aktywność cytozolowego enzymu dehydrogenazy mleczanowej, wyciekającego do medium zewnątrzkomórkowego w wyniku uszkodzeń błon komórkowych (26).

W celu uwierzytelnienia proteolitycznej aktywności neutrofilów wobec hepatocytów użyto aprotyniny – diagnostycznego inhibitora proteaz serynowych. Dodanie aprotyniny (10 µg/ml) do wspólnej hodowli hepatocytów i komórek Kupffera w obecności ołowiu, lipopolisacharydu i neutrofilów istotnie ograniczyło śmierć hepatocytów na drodze proteolizy (26).

Warto również zwrócić uwagę na inny opisany w literaturze mechanizm destrukcyjnego działania jonów ołowiu na wątrobę. Mechanizm ten opiera się na inhibicji aktywności błonowych pomp jonowych. Kompleksy tych białek enzymatycznych mają kluczowe znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu transbłonowych procesów metabolicznych. U szczurów pod wpływem ołowiu stwierdzono znaczący spadek aktywności trzech ATP-az ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ). Jest wysoce prawdopodobne, że spadek aktywności tych pomp jonowych wynika z zaburzenia płynności błon komórkowych na skutek intensyfikacji procesów lipoperoksydacji (27).

Jony ołowiu mogą również w istotny sposób wpływać na aktywność esteraz cholinowych. Są to enzymy syntetyzowane w wątrobie, a następnie wydzielane do krwioobiegu. Wyróżnia się acetylocholinoesterazę (acetylcholinesterase – AChE) o działaniu specyficznym oraz pseudocholinoesterazę (pseudocholinesterase – PChE), która może działać na estry znacznie różniące się od estrów cholinowych. Dhir i Dhand (28) u dorosłych samic szczurów chronicznie narażonych na doustne zatrucie ołowiem odnotowali drastyczny spadek aktywności acetylocholinoesterazy w homogenatach wątroby. Uzyskany wynik może świadczyć o uszkodzeniu mięszu wątroby i pogorszeniu jej funkcjonowania. Mechanizm ten jest o tyle istotny, że AChE katalizuje reakcję rozpadu neuroprzekaźnika acetylocholino do choliny i grupy acetylowej, uczestnicząc tym samym w powstawaniu i przekazywaniu impulsów nerwowych w przywspółczulnym układzie nerwowym. Spadek aktywności AChE może zatem manifestować się zaburzeniami w cholinergicznym synaptycznej transmisji.

Jak wskazują autorzy prac eksperymentalnych, jony ołowiu zaburzają metabolizm endogennych hormonów steroidowych w wątrobie. Pandya i wsp. (29) u dorosłych samców szczurów ekspozowanych na ołów zaobserwowali istotny spadek aktywności enzymów uczestniczących w biotransformacji steroidów (dehydrogenazy  $17\beta$ -hydroksysteroidowej oraz UDP-glukuronylotransferazy). Zmiany te mogą prowadzić do niewydolności wątroby, powodując tym samym różnego rodzaju zaburzenia hormonalne z patologicznymi konsekwencjami dla całego organizmu.

## PODSUMOWANIE

Obecność związków ołowiu w środowisku bytowania człowieka i zwierząt, zdolność do bioakumulacji oraz bezpośredniego lub pośredniego uszkodzenia komórek stanowią istotny problem toksykologiczny i wyzwanie dla zdrowia publicznego, zwłaszcza przy przewlekłej ekspozycji na związki tego metalu. Poznawanie biochemicznych mechanizmów toksyczności ołowiu jest niezwykle cenne. Stwarza to realne szanse poszukiwania i wdrażania nowych sposobów profilaktyki. Szczególną uwagę powinno przykładać się do opracowywania i wprowadzania zgodnych z najnowszą wiedzą naukową zasad profilaktyki medycznej dla osób zawodowo narażonych na związki ołowiu.

## PIŚMIENNICTWO

1. Labudda M.: Biochemiczne mechanizmy neurotoksyczności kadmu. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.* 2011;62:357–363
2. Shalan M.G., Mostafa M.S., Hassouna M.M., Hassab El-Nabi S.E., El-Refaie A.: Amelioration of lead toxicity on rat liver with vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology* 2005;206(1):1–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.07.006>
3. Yücebilgiç G., Bilgin R., Tamer L., Tükel S.: Effects of lead on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activities and lipid peroxidation in blood of workers. *Int. J. Toxicol.* 2003;22:95–97, <http://dx.doi.org/10.1080/10915810305096>
4. Patra R.C., Swarup D., Dwivedi S.: Antioxidant effects of  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead-induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 2001;162:81–88, [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00345-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00345-6)
5. Loghman-Adham M.: Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Environ. Health Perspect.* 1997;105:928–938, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.97105928>
6. Vargas I., Castillo C., Posadas F., Escalante B.: Acute lead exposure induces renal haeme oxygenase-1 and decreases urinary  $\text{Na}^+$  excretion. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003;22:237–244, <http://dx.doi.org/10.1191/0960327103ht360oa>
7. Moreira E.G., Rosa G.J.M., Barros S.B.M., Vassilieff V.S., Vassilieff I.: Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology* 2001;169:145–151, [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00497-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00497-8)
8. Soltaninejad K., Kebriaeezadeh A., Minaiee B., Ostad S.N., Hosseini R., Azizi E. i wsp.: Biochemical and ultrastructural evidences for toxicity of lead through free radicals in rat brain. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003;22:417–423

9. Bunn T.L., Parsons P.J., Kao E., Dietert R.R.: Exposure to lead during critical windows of embryonic development: differential immunotoxic outcome based on stage of exposure and gender. *Toxicol. Sci.* 2001;64:57–66, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/64.1.57>
10. Bunn T.L., Parsons P.J., Kao E., Dietert R.R.: Gender-based profiles of developmental immunotoxicity to lead in the rat: assessment in juveniles and adults. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2001;64:223–240, <http://dx.doi.org/10.1080/15287390152543708>
11. Ercal N., Neal R., Treeratphan P., Lutz P.M., Hammond T.C., Dennery P.A. i wsp.: A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed Fisher 344 rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2000;39:251–256, <http://dx.doi.org/10.1007/s002440010102>
12. Razani-Boroujerdi S., Edwards B., Sopori M.L.: Lead stimulates lymphocyte proliferation through enhanced T cell – B cell interaction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;288:714–719
13. Mousa H.M., Al-Qarawi A.A., Ali B.H., Abdel Rahman H.A., ElMougy S.A.: Effect of lead exposure on the erythrocytic antioxidant levels in goats. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2002;49:531–534, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00499.x>
14. Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P.: Combined efficacies of lipoic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid on lead induced erythrocyte membrane lipid peroxidation and antioxidant status in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003;22:183–192, <http://dx.doi.org/10.1191/0960327103ht335oa>
15. Chaurasia S.S., Kar A.: Protective effects of vitamin E against lead induced deterioration of membrane associated type-I iodothyronine 5-monodeiodinase (5D-I) activity in male mice. *Toxicology* 1997;124:203–209, [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(97\)00155-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(97)00155-8)
16. Comporti M.: Biology of disease: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* 1985;53:599–623
17. Sandhir R., Gill K.D.: Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 1995;48:91–97, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02789081>
18. Talmage R.V., Vander Wiel C.J., Norimatsu H.: A re-evaluation of the cause of acute hypercalcemia following intravenous administration of lead acetate. *Calcif. Tissue Res.* 1978;26:149–153, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02013250>
19. Tandon S.K., Singh S., Prasad S., Mathur N.: Influence of lysine and zinc administration during exposure to lead or lead and ethanol in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 1997;57:51–58, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02803869>
20. Moussa S.A., Bashandy S.A.: Biophysical and biochemical changes in the blood of rats exposed to lead toxicity. *Rom. J. Biophys.* 2008;18:123–133
21. United States Environmental Protection Agency.: Air Quality Criteria for Lead (Final). Cz. 3. U.S. Environmental Protection Agency, Washington 1986, ss. 264–267
22. Odenbro A., Arrhenius E.: Effects of triethyllead chloride on hepatic microsomal N- and C-oxygenation of N,N-dimethylaniline in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984;74:357–363, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90289-8](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(84)90289-8)
23. Nakagawa K.: Decreased glutathione S-transferase activity in mice livers by acute treatment with lead, independent of alteration in glutathione content. *Toxicol. Lett.* 1991;56:13–17, [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274\(91\)90085-K](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274(91)90085-K)
24. Daggett D.A., Nuwaysir E.F., Nelson S.A., Wright L.S., Kornguth S.E., Siegel F.L.: Effects of triethyl lead administration on the expression of glutathione S-transferase isoenzymes and quinone reductase in rat kidney and liver. *Toxicology* 1997;117:61–71, [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(96\)03555-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(96)03555-X)
25. Daggett D.A., Oberley T.D., Nelson S.A., Wright L.S., Kornguth S.E., Siegel F.L.: Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology* 1998;128:191–206, [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00080-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00080-8)
26. Milosevic N., Maier P.: Lead stimulates intercellular signaling between hepatocytes and Kupffer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;401:317–328, [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00473-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00473-8)
27. Kharoubi O., Slimani M., Aoues A., Seddik L.: Prophylactic effects of Wormwood on lipid peroxidation in an animal model of lead intoxication. *Indian J. Nephrol.* 2008;18(2):51–57, <http://dx.doi.org/10.4103/0971-4065.42333>
28. Dhir V., Dhand P.: Toxicological approach in chronic exposure to lead on reproductive functions in female rats (*Rattus norvegicus*). *Toxicol. Int.* 2010;17:1–7, <http://dx.doi.org/10.4103/0971-6580.68340>
29. Pandya C.D., Pillai P.P., Gupta S.S.: Lead and cadmium co-exposure mediated toxic insults on hepatic steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 2010;134(3):307–317, <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-009-8479-6>