

Dominika Stolecka¹
Urszula Błaszczyk¹
Jolanta Zalejska-Fiolka¹
Ewa Romuk¹
Aleksander Owczarek²
Ewa Birkner¹

WPŁYW METIONINY I WITAMINY E NA STRES OKSYDACYJNY OCENIANY W WĄTROBIE SZCZURÓW NARAŻONYCH NA DZIAŁANIE FLUORKU SODU

THE INFLUENCE OF METHIONINE AND VITAMIN E ON OXIDATIVE STRESS IN RATS' LIVER EXPOSED TO SODIUM FLUORIDE

¹ Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach / Medical University of Silesia in Katowice, Zabrze, Poland
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Katedra Biochemii / School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Department of Biochemistry

² Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach / Medical University of Silesia in Katowice, Sosnowiec, Poland
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Zakład Statystyki, Katedra Analizy Instrumentalnej / School of Pharmacy with the Division of Laboratory Medicine in Sosnowiec, Department of Statistics, Department of Instrumental Analysis

STRESZCZENIE

Wstęp: Fluor wpływa na wiele procesów zachodzących w organizmie. Kontrowersje dotyczące oceny działania związków fluoru na ustrój wynikają głównie z wąskiego zakresu stężeń pomiędzy dawkami tolerowaną i toksyczną. W jednym z mechanizmów toksycznego działania fluoru znaczącą rolę odgrywa jego zdolność do wywoływania stresu oksydacyjnego poprzez generowanie wolnych rodników i zmniejszenie wydajności enzymatycznego układu antyoksydacyjnego. Istotnym kierunkiem badań jest poszukiwanie interakcji fluoru z innymi substancjami, które mogą zarówno zwiększać, jak i zmniejszać efekty jego działania. **Materiał i metody:** Eksperyment trwał 35 dni. Poddane badaniom 24 szczury podzielono na 4 grupy: kontrolną, z dietą z dodatkiem fluorku sodu (NaF), z dietą z dodatkiem fluorku sodu, metioniny i witaminy E (NaF+M+E) oraz z dietą z dodatkiem fluorku sodu i witaminy E (NaF+E). W homogenatach wątroby zwierząt oznaczono: aktywność całkowitej dysmutazy nadtlenkowej (total superoxide dismutase – t-SOD), izoenzymu cytoplazmatycznego (superoxide dismutase with copper and zinc – CuZnSOD), izoenzymu mitochondrialnego (superoxide dismutase with manganese – MnSOD), peroksydazy glutationowej (glutathione peroxidase – GPX), katalazy (catalase – CAT), reduktazy glutationowej (glutathione reductase – GR), transferazy S-glutationowej (glutathione S-transferase – GST) oraz stężenie dialdehydu malonowego (malondialdehyde – MDA). **Wyniki:** Zaobserwowano statystycznie istotnie zmiany w aktywności CuZnSOD, GPX i CAT oraz stężenia MDA. Dla t-SOD, MnSOD, GR i GST nie stwierdzono zmian statystycznie istotnych. **Wnioski:** W warunkach eksperymentu doszło do wyczerpania enzymatycznej ochrony antyoksydacyjnej organizmu w obrębie komórek wątrobowych, obserwowanej poprzez obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych (CAT i GPX) i wzrost stężenia MDA w grupie NaF. Dodatek witaminy E i metioniny nie stymuluje istotnie enzymatycznego układu antyoksydacyjnego, wpływa jednak korzystnie na obniżenie stężenia MDA w komórkach wątrobowych. Med. Pr. 2018;69(4):403–412

Słowa kluczowe: szczury, witamina E, enzymy antyoksydacyjne, NaF, metionina, MDA

ABSTRACT

Background: Fluorine influences many processes occurring in the organism. Controversies over the evaluation of the biological effects of this substance are due to a small difference between tolerable and toxic fluorine doses. One of the main mechanisms of the fluorine toxic action is its ability to induce oxidative stress via reactive oxygen species generation and antioxidant defense system impairment. It is important to evaluate possible interactions between fluorine and other substances that may increase or decrease its toxicity. **Material and Methods:** The study lasted for 35 days. Twenty-four rats were divided into 4 groups: the control, with sodium fluoride (NaF) in the diet, with sodium fluoride, methionine and vitamin E (NaF+M+E) in the diet, with sodium fluoride and vitamin E (NaF+E) in the diet. The biochemical analysis conducted in animal liver homogenates included determination of activities of: total superoxide dismutase (t-SOD), superoxide dismutase with copper and zinc (CuZnSOD), superoxide dismutase with manganese (MnSOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and the malondialdehyde (MDA) concentration. **Results:** The activities of CuZnSOD, GPX, CAT and MDA concentration were changed significantly. There were no differences in the activities of t-SOD, MnSOD, GR and GST among the experiment. **Conclusions:** In the conducted experiment, the run-out of enzymatic protection of liver by decreasing of the activities of antioxidant enzymes (CAT and GPX) and increasing the MDA concentration in NaF group was observed. The addition of vitamin E and methionine does not significantly stimulate the enzymatic antioxidant system, however, it causes of MDA concentration decreases. Med Pr 2018;69(4):403–412

Key words: rats, vitamin E, antioxidant enzymes, NaF, methionine, MDA

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Urszula Błaszczuk, Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Katedra Biochemii, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze, e-mail: ublaszczuk@sum.edu.pl
Nadesłano: 23 października 2017, zatwierdzono: 20 lutego 2018

WSTĘP

Przeciwność właściwości fluorków, mające korzystny wpływ na organizm człowieka, są powszechnie znane. Długotrwałe narażenie na związki fluoru może jednak prowadzić do zaburzenia funkcjonowania ustroju. Badania nad wpływem fluorków na organizmy żywe wykazały, że fluor – jako pierwiastek o dużej aktywności biologicznej – oddziałuje na wiele zachodzących w nich procesów. Małe rozmiary i duża aktywność jonu fluorkowego powodują jego przenikanie do różnych komórek, tkanek i narządów.

W badaniach wykazano, że intoksykacja zwierząt związkami fluoru może zaburzać metabolizm w wątrobie i prowadzić do jej uszkodzenia. Liczne kontrowersje dotyczące działania związków fluoru wynikają głównie z wąskiego marginesu między stężeniami tolerowanymi przez organizm a działającymi toksycznie [1]. Fluor jako prooksydant indukuje wzmożone procesy wolnorodnikowe i w zależności od dawki oraz czasu ekspozycji może obniżać aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa.

W ostatnich latach opublikowano wiele prac opisujących wpływ fluorków na proces oddychania komórkowego i powiązane z nim reakcje wolnorodnikowe. Wykazano stymulujący wpływ jonu fluorkowego na syntezę rodnika ponadtlenkowego. Mechanizm tego działania polega prawdopodobnie na zainicjowaniu tzw. wybuchu tlenowego [2].

Istotnym kierunkiem badań nad wpływem fluoru na funkcjonowanie organizmów żywych jest poszukiwanie jego interakcji z innymi substancjami, które mogą zarówno zwiększać, jak i zmniejszać efekty jego działania. Z uwagi na liczne doniesienia dotyczące korzystnego wpływu witaminy E i metioniny na organizmy żywe istotne wydaje się przeprowadzanie badań oceniających wpływ tych substancji na stres oksydacyjny w wątrobie szczurów narażonych na fluorek sodu.

Witamina E jest aktywnym lipofilnym przeciwutleniaczem przerywającym reakcje łańcuchowe generujące wolne rodniki. Najważniejszą jej rolę jest zapobieganie utlenianiu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych. Właściwości antyoksydacyjne

witaminy E zależą od grupy hydroksylowej znajdującej się w pozycji 6. układu chromanowego. Atom wodoru w tej grupie uczestniczy w wygaszaniu tlenu singletowego i hamowaniu tworzenia rodników nadtlenkowych. Witamina E, oddając wodór, przekształca się w nieaktywny rodnik tokoferylowy, który może być regenerowany przede wszystkim przez witaminę C i glutation, ale również przez metioninę. Jest to szczególnie ważne, ponieważ metionina jako związek hydrofobowy występuje w błonach komórkowych. Bierze ona udział w syntezie glutationu oraz w wiązaniu i transporcie selenu, który wchodzi w skład peroksydazy glutationowej oraz reduktazy sulfotlenku metioniny i reduktazy tioredoksyny. Synteza i czynność tych enzymów wymagają obecności selenu, co jest istotne podczas zwiększonej podaży fluorków, ponieważ fluor powoduje nasilone wydalanie selenu z moczem i niedobory tego pierwiastka w organizmie [3,4].

Celem pracy była ocena wpływu łącznego podawania fluorku sodu, metioniny i witaminy E na stan oksydacyjny wątroby szczura poprzez zbadanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenia dialdehydu malonowego w homogenatach wątroby szczura.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 24 szczurach, samcach szczepu Wistar FL w wieku 4 miesięcy o wadze początkowej 300 ± 5 g i wadze końcowej 350 ± 5 g. Zwierzęta pochodziły z hodowli Centralnej Zwierzętarń Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Na badania uzyskano zgodę Uczelnianej Komisji Bioetycznej do Badań na Zwierzętach nr NN-6503-29/06.

Po 2-tygodniowym okresie adaptacyjnym szczury podzielono na 4 grupy (N = 6) według schematu:

1. Grupa kontrolna (K) – otrzymywała wodę destylowaną i paszę standardową.
2. Grupa badana (NaF) – otrzymywała roztwór fluorku sodu w wodzie destylowanej (NaF, prod. POCH, Gliwice) w dawce 10 mg F⁻/kg masy ciała (mc.) / 24 godz. w objętości 10 ml.
3. Grupa badana (NaF+M+E) – otrzymywała roztwór fluorku sodu jak wyżej z dodatkiem metioniny w dawce 2 mg/szczura/24 godz. i witaminy E w dawce 3 mg/szczura/24 godz.

4. Grupa badana (NaF+E) – otrzymywała roztwór fluoru sodu w dawce jak wyżej łącznie z witaminą E w dawce jak wyżej.

Badanie miało na celu głównie określenie roli metioniny jako substancji współdziałającej z witaminą E, dlatego nie badano grupy zwierząt narażonych na fluor i metioninę.

W czasie trwania eksperymentu zwierzęta przebywały w standardowych warunkach laboratoryjnych, w pomieszczeniach o stałej temperaturze pokojowej ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) i stałej wilgotności powietrza (50–70%), pojedynczo w klatkach, z zachowaniem oświetleniowych cykli 12-godzinnych (faza jasna – 7:00–19:00, faza ciemna – 19:00–7:00). Szczury poiono wodą destylowaną w ilości 40 ml (w grupach badanych podawano 10 ml wody z NaF i uzupełniano 30 ml w celu zapewnienia zapotrzebowanie dziennego). Zwierzęta ważono co tydzień. Paszę podawano raz dziennie. Dzielne racjonowanie paszy przeliczano na kilogram masy ciała zwierząt i wynosiło ono 100 g paszy/kg mc./24 godz. Spożycie paszy kontrolowano, oceniając pozostawione resztki pokarmowe. Ilość stosowanych dodatków przeliczano na masę zwierzęcia i modyfikowano z czasem trwania eksperymentu. Wszystkie szczury otrzymywały paszę standardową wyprodukowaną w Zakładzie Żywności Zwierząt Instytutu Zootechnicznego w Brzezinach.

Eksperyment trwał 35 dni [1]. Po tym czasie zwierzęta usypiano, stosując iniekcję dootrzewnową z użyciem 1% roztworu heksobarbitalu w dawce 0,5 ml na 100 g mc. szczura. Zastosowany środek usypiający nie wpływa na wyniki przeprowadzanych badań.

Oznaczenia biochemiczne wszystkich analizowanych parametrów przeprowadzono w homogenatach wątroby. Stężenie białka oznaczano metodą Lowry'ego [5].

Pozyskiwanie homogenatów wątroby do badań biochemicznych

Podczas sekcji od każdego zwierzęcia pobierano wycinek z dolnego odcinka prawego płata wątroby uprzednio perfundowanej, po czym sporządzano 10% homogenat z użyciem 0,9% NaCl. Uzyskane w ten sposób homogenaty służyły do dalszych oznaczeń biochemicznych.

Oznaczenie aktywności dysmutazy nadtlenkowej całkowitej (t-SOD) oraz jej izoenzymów mitochondrialnego (MnSOD) i cytoplazmatycznego (CuZnSOD) (EC 1.15.1.1)

Aktywność enzymu i jego izoenzymów oznaczono według Oyanagui [6]. Anionorodnik nadtlenkowy wytwarzany przy udziale oksydazy ksantynowej reaguje

z hydroksylaminą, wytwarzając jon nitrozowy, który po połączeniu z naftylenodiaminą i kwasem sulfoanilinowym daje barwne połączenie. Do 50 μl próbki dodawano 0,1 ml roztworu hipoksantyny i 0,1 ml mieszaniny chlorowodoru hydroksylaminy oraz hydroksylaminy. Po inkubacji (37°C , 5 min) dodawano 0,2 ml roztworu enzymatycznego oksydazy ksantynowej i po kolejnej inkubacji (37°C , 30 min) – reagent barwny zawierający kwas octowy, naftylenodiaminę i kwas sulfoanilinowy. Równolegle do każdej próby badanej wykonywano próbę kontrolną z cyjankiem potasu (KCN) jako inhibitorem. Pozwoliło to na wyznaczenie aktywności izoenzymu mitochondrialnego (superoxide dismutase with manganese – MnSOD). Aktywność izoenzymu cytoplazmatycznego (superoxide dismutase with copper and zinc – CuZnSOD) wyznaczano z różnicy aktywności dysmutazy nadtlenkowej całkowitej (total superoxide dismutase – t-SOD) i MnSOD. Odczytów dokonywano względem próby zwierającej zamiast badanej próbki wodę bidestylowaną przy długości fali 560 nm z wykorzystaniem czytnika Victor X3 (prod. PerkinElmer, USA).

Metoda jest w pełni swoista dla dysmutazy nadtlenkowej i jej izoenzymów. Aktywność enzymatyczną wyrażono w jednostkach nitrowych (NU)/mg białka. Jedna jednostka nitrowa oznacza zdolność do zmniejszenia powstawania jonu nitrowego o 50% względem wartości wyjściowych przy obecności dysmutazy nadtlenkowej (superoxide dismutase – SOD).

Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (GPX) (EC 1.11.1.9)

Aktywność peroksydazy glutationowej (glutathione peroxidase – GPX) oznaczono według zasady metody Paglia i Valentine na podstawie reakcji zredukowanego glutationu (reduced glutathione – GSH) z nadtlenkiem t-butyłu [7]. Utleniony w tej reakcji glutation (disulfide glutathione – GSSG) jest następnie regenerowany w obecności reduktazy glutationowej i NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). Do 10 μl homogenatu wątroby rozcieńczonego w stosunku 1:12 dodawano mieszaninę reagującą (zawierającą NADPH, GSH i reduktazę glutationową). Po ustabilizowaniu się reakcji wstępnej dodawano 25 μl roztworu t-butyłu, odczytywano absorbancję przy długości fali 355 nm i śledzono kinetykę zmian absorbancji co 60 s przez 3 min. Oznaczenia wykonywano z wykorzystaniem czytnika Victor X3. Aktywność GPX wyrażono w IU/g białka. Metoda jest swoista dla peroksydazy glutationowej.

Oznaczanie aktywności reduktazy glutationowej (GR) (EC 1.6.4.2)

Aktywność reduktazy glutationowej (glutathione reductase – GR) oznaczono według Richtera [7] zmodyfikowaną metodą półautomatyczną. Metoda ta bazuje na oznaczeniu zmian stężenia zredukowanego NADPH, który ulega reakcji z utlenionym glutationem. Do 25 µl homogenatu rozcieńczonego 1:10 dodawano 125 µl 6 mmol/l roztworu NADPH. Po ustabilizowaniu się reakcji wstępnej dodawano 25 µl roztworu 75 mmol/l utlenionego glutationu, odczytywano absorbancję przy długości fali 355 nm i śledzono kinetykę zmian absorbancji co 60 s przez 3 min z wykorzystaniem czytnika Victor X3. Aktywność wyrażono w IU/g białka. Metoda jest swoista dla reduktazy glutationowej.

Oznaczanie aktywności transferazy-S-glutationowej (GST) (EC 2.5.1.18)

Aktywność transferazy-S-glutationowej (glutathione S-transferase – GST) oznaczono metodą kinetyczną według Habiga i Jakobego [8]. Do 10 µl próbki dodawano 184 µl mieszaniny reagującej zawierającej zredukowany glutation. Po ustabilizowaniu się reakcji wstępnej dodawano 6 µl roztworu 1-chloro-2,3-dinitrobenzenu w alkoholu etylowym, odczytywano absorbancję przy długości fali 355 nm i śledzono kinetykę zmian absorbancji co 60 s przez 3 min z wykorzystaniem czytnika Victor X3. Aktywność GST wyrażono w IU/g białka. Metoda jest swoista dla transferazy-S-glutationowej.

Oznaczanie aktywności katalazy (CAT) (EC 1.11.1.6)

Katalazę (catalase – CAT) oznaczano metodą kinetyczną według Aebi [9]. Homogenat przed oznaczeniem katalazy rozcieńczono 100-krotnie buforem TRIS/HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride) o pH 7,4. Oznaczenia kinetyczne prowadzono w kuwecie kwarcowej. Zmieszano 2,5 ml substratu składającego się z 50 mmol/l buforu TRIS/HCl o pH 7,4 i perhydrolu z 50 µl próbki. Po 10 s odczytywano absorbancję przy długości fali 240 nm i śledzono kinetykę zmian absorbancji co 15 s przez 3 min z wykorzystaniem spektrofotometru UV-1700 (prod. Shimadzu, Japonia). Aktywność enzymatyczną wyrażono w kIU/g białka. Metoda jest swoista dla katalazy.

Oznaczenie stężenia dialdehydu malonowego (MDA)

Stężenie dialdehydu malonowego (malondialdehyde – MDA) oznaczano według Ohkawy i wsp. [10], wyko-

rzystując jego reakcją z kwasem tiobarbiturowym. Do odczytu wykorzystano spektrofluorymetr LS45 (prod. PerkinElmer, USA) przy długości fali 515 nm (wzbudzenie) i 522 nm (emisja). Odczyt spektrofluorymetryczny jest bardziej swoisty od spektrofotometrycznego (przy długości fali 532 nm), ponieważ nie przeszkadzają interferencje ze strony hemoglobiny i barwników żółciowych. Metoda została zmodyfikowana poprzez dodanie siarczanu(VI) sodu i BHT (butylowany hydroksytoluen), co dodatkowo podniosło jej swoistość. Stężenia MDA odczytano z krzywej standardowej, stosując jako standard 1,1,3,3-tetraetoksypropan, i wyrażono w µmol/g białka.

Ocena histopatologiczna

Podczas sekcji szczurów pobrano wątroby tych zwierząt do oceny histopatologicznej, dalej poddano je ocenie makroskopowej, a następnie utrwalono w formalinie. Ocena histopatologiczną przeprowadzono z wykorzystaniem preparatów wykonanych zwykłą techniką parafinową, zabarwionych metodą przeglądową przy użyciu hematoksyliny i eozyny (H-E) [11]. Zmiany morfologiczne oceniono w mikroskopie świetlnym (prod. Olympus, Niemcy) przy powiększeniu 50×, 100×, 200×, 400× i 600×.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu statystycznego Statistica 10.0. Dane przedstawiono jako wartość średnią (mean – M) ± odchylenie standardowe (standard deviation – SD). Normalność rozkładu otrzymanych wyników oceniono testem Shapiro-Wilka. Wyniki porównań analizowanych wskaźników między grupami zobrazowano na rycinach, prezentując wartości średnie z przedziałami ufności w każdej z grup zwierząt. Za istotne statystycznie przyjęto wyniki, dla których $p < 0,05$.

WYNIKI

Podczas badań zwierzęta wszystkich grup podobnie przybierały na wadze. Nie zaobserwowano niekorzystnych zmian w ich wyglądzie i zachowaniu (pojenie i skarmianie). Przeżywalność wyniosła 100%.

Dla parametrów wykazujących istotność statystyczną (CuZnSOD, GPX, CAT, MDA) wyniki przedstawiono na rycinach 1–4. W tabeli 1. zaprezentowano wyniki pozostałych oznaczanych parametrów (MnSOD, t-SOD, GR, GST), dla których nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupami badanymi i względem grupy kontrolnej.

Tabela 1. Aktywność całkowitej dysmutazy ponadtlenkowej (t-SOD), izoenzymu mitochondrialnego (MnSOD), reduktazy glutationowej (GR) i transferazy S-glutationowej (GST) w homogenatach wątroby szczura
Table 1. The activity of superoxide dismutase (t-SOD), mitochondrial isoenzyme (MnSOD), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) in the rat's liver homogenates

Grupa Group	t-SOD		MnSOD		GR		GST	
	[NU/mg białka / of protein]		[NU/mg białka / of protein]		[IU/g białka / of protein]		[IU/g białka / of protein]	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
K	209,15	33,31	107,48	23,62	62,18	15,29	81,25	15,34
NaF	234,34	50,07	79,47	24,94	78,11	14,52	67,63	14,09
NaF+M+E	214,67	33,56	81,17	25,60	74,37	13,07	70,94	13,17
NaF+E	249,87	46,27	83,67	25,41	85,97	16,11	75,22	7,12

K – grupa kontrolna / control group, NaF – dieta z fluorkiem sodu / diet with sodium fluoride, NaF+M+E – dieta z fluorkiem sodu + metioniną + witaminą E / diet with sodium fluoride + methionine + vitamin E, NaF+E – dieta z fluorkiem sodu + witaminą E / diet with sodium fluoride + vitamin E.

\bar{x} – średnia ważona / weighted mean.

SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

Na rycinie 1. przedstawiono aktywność izoenzymu cytoplazmatycznego dysmutazy ponadtlenkowej CuZnSOD w homogenatach wątrobowych we wszystkich badanych grupach zwierząt. Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost aktywności CuZnSOD w grupie NaF+M+E o 46% i w grupie NaF+E o 74% w porównaniu z grupą kontrolną.

Na rycinie 2. przedstawiono aktywność peroksydazy glutationowej GPX w homogenatach wątrobowych we wszystkich badanych grupach zwierząt. Wykazano istotne statystycznie obniżenie aktywności GPX o 49%, porównywalne we wszystkich badanych grupach w stosunku do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między badanymi grupami.

Na rycinie 3. przedstawiono aktywność katalazy CAT w homogenatach wątrobowych we wszystkich grupach zwierząt. Wykazano statystycznie istotne obniżenie aktywności CAT o 38%, porównywalne we wszystkich grupach badanych zwierząt w stosunku do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych różnic między badanymi grupami.

Na rycinie 4. przedstawiono stężenie MDA w homogenatach wątrobowych we wszystkich grupach zwierząt. Wykazano statystycznie istotny wzrost stężenia MDA w grupie zwierząt otrzymujących fluorki (NaF) w stosunku do grupy kontrolnej. W grupie NaF+M+E oraz NaF+E zaobserwowano natomiast istotne statystycznie obniżenie stężenia MDA o 62% w porównaniu z grupą NaF.

Ocena histopatologiczna

Ocena makroskopowa

Nie zaobserwowano żadnych zmian w zakresie kształtu, wielkości, barwy i konsystencji wątroby w grupach

otrzymujących fluor oraz fluor z antyoksydantami w stosunku wątroby szczurów z grupy kontrolnej.

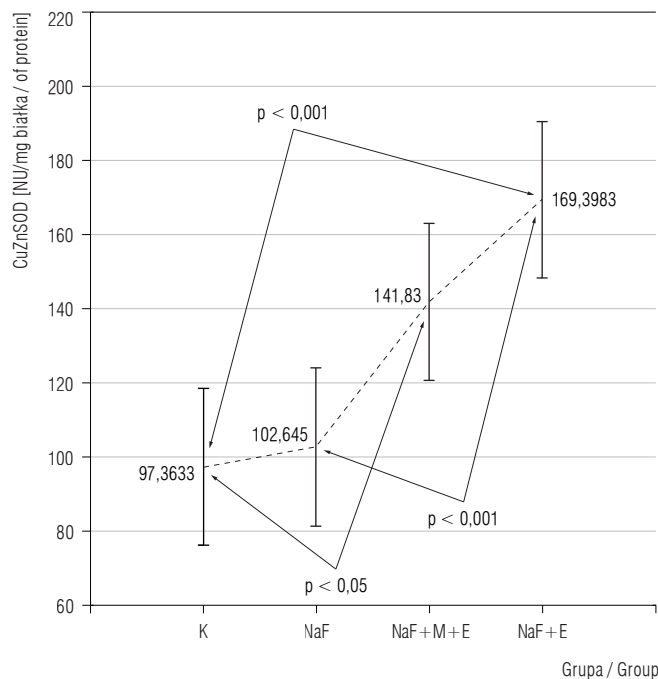
Ocena mikroskopowa

W ocenie stopnia uszkodzenia wątroby u szczurów obciążonych dietą zawierającą fluorek sodu lub NaF i antyoksydanty zastosowano następujące kryteria: ocenę zmian morfologicznych w hepatocytach, tkanki łącznej zrębowej i przestrzeni bramno-żółciowych. Nie wykazano żadnych zmian w obrazie mikroskopowym wątroby szczurów w grupie kontrolnej. W wątrobach szczurów w grupie narażonej na NaF stwierdzono natomiast różne zmiany patomorfologiczne. Przede wszystkim zaobserwowano przekrwienie w zrazikach, mikro-nacieki złożone z komórek jednojądrzastych między hepatocytami, ale także w okolicy triad wątrobowych.

Powyższym zmianom towarzyszyły zmiany wsteczne w hepatocytach, takie jak zwyrodnienie wodniczkowe i martwica, zarówno rozsiana, jak i obejmująca większe fragmenty mięszu (zrazików). Podanie witaminy E szczurom z grupy badanej NaF+E wykazało działanie protekcyjne na wątrobę. Obserwowane wyżej zmiany pojawiły się w wątrobie, przy czym nie dotyczyły one wszystkich zwierząt. Wystąpiły u 4 szczurów, a ich nasilenie było nieco słabsze w stosunku do zmian obserwowanych po narażeniu na fluorek. Z kolei w wątrobach szczurów w grupie badanej NaF+M+E zaobserwowano jedynie nieliczne nacieki między hepatocytami, występujące u 3 zwierząt.

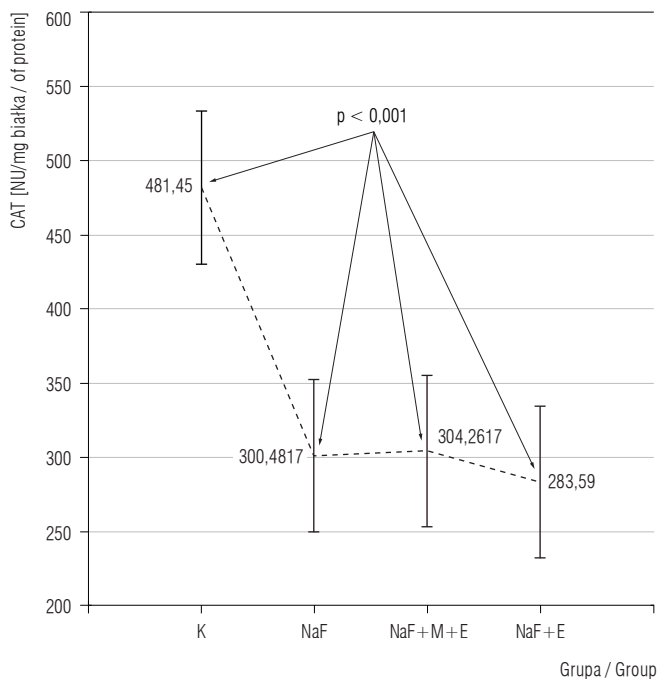
OMÓWIENIE

Narażenie na związki fluoru jest różne, zależne od położenia geograficznego i stopnia urbanizacji terenu.



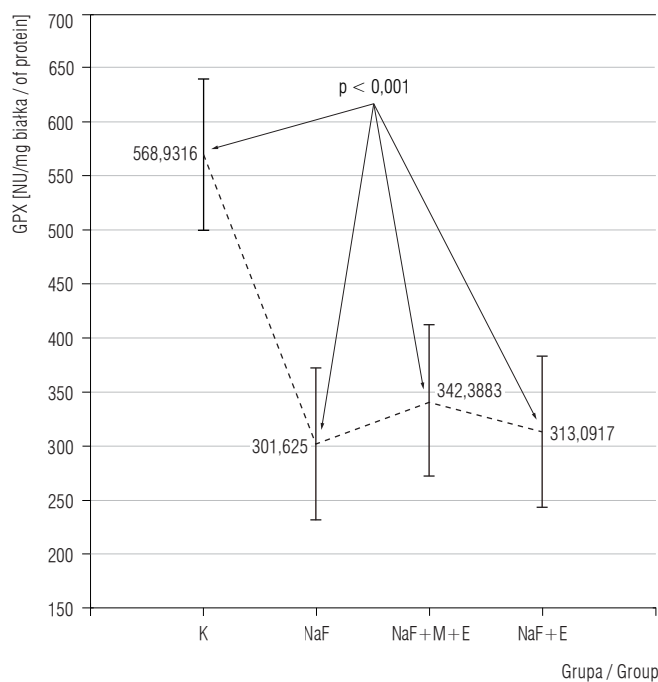
Objaśnienia jak w tabeli 1 / Explanations as in Table 1.

Ryc. 1. Aktywność izoenzymu cytoplazmatycznego dysmutazy ponadtlenkowej (CuZnSOD) w homogenatach wątrobowych szczurów w 4 badanych grupach
Fig. 1. The activity of cytosolic superoxide dismutase (CuZnSOD) in the liver homogenates of rats in 4 examined groups



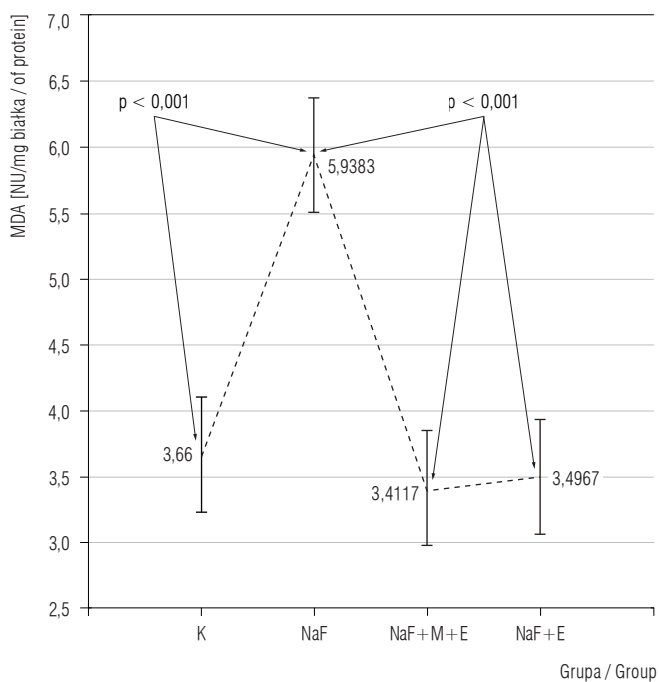
Objaśnienia jak w tabeli 1 / Explanations as in Table 1.

Ryc. 3. Aktywność katalazy (CAT) w homogenatach wątrobowych szczurów w 4 badanych grupach
Fig. 3. The activity of catalase (CAT) in the liver homogenates of rats in 4 examined groups



Objaśnienia jak w tabeli 1 / Explanations as in Table 1.

Ryc. 2. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPX) w homogenatach wątrobowych szczurów w 4 badanych grupach
Fig. 2. The activity of glutathione peroxidase (GPX) in the liver homogenates of rats in 4 examined groups



Objaśnienia jak w tabeli 1 / Explanations as in Table 1.

Ryc. 4. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w homogenatach wątrobowych szczurów w 4 badanych grupach
Fig. 4. Malondialdehyde (MDA) concentration in the liver homogenates of rats in 4 examined groups

Ilość fluorków pobierana z pożywieniem wynosi 1,7–4,75 mg/dobę, a z wodą pitną – ok. 1 mg/dobę. Zawartość fluorków w żywności zależy od wielu czynników środowiskowych i sposobu jej produkcji. Stałe składniki diety, które mogą stanowić istotne źródło narażenia na fluor, to głównie owoce morza i ryby (6–27 mg/dobę) [12]. Z kolei narażenie na fluor stanowi jeden z czynników indukujących stres oksydacyjny organizmu.

Zgodnie z wolnorodnikową teorią patogenezы zapalenia wątroby przewlekły proces zapalny jest konsekwencją utrzymującego się stresu oksydacyjnego, a postępująca destrukcja i wyniszczenie tkanek mogą wynikać z pogłębiającego się deficytu układu antyoksydacyjnego w komórkach wątroby [13]. Stąd bada się związki zarówno wykazujące działanie prooksydacyjne, do których należy m.in. fluor, jak i o potencjalnym działaniu antyoksydacyjnym, np. witamina E i metionina.

Zjawisko interakcji między wolnymi rodnikami czy reaktywnymi formami tlenu (RFT) a składnikami lipidowymi błon biologicznych można oceniać na podstawie wyników oznaczeń stężenia dialdehydu malonowego (MDA), jednego z głównych końcowych produktów procesu peroksydacji lipidów.

Obserwowane w niniejszym badaniu zwiększone stężenie MDA w grupie otrzymującej wyłącznie fluorki pozwala wnioskować, że fluorek sodu zastosowany w dawce 10 mg/kg mc./24 godz. indukował wzmożone procesy wolnorodnikowe w wątrobie. Podobne wyniki uzyskali dla takiej samej dawki autorzy innych prac [14,15].

Zastosowane w badaniu witamina E i metionina, jako substancje o potencjalnym charakterze antyoksydacyjnym, znosiły efekt wywołany przez fluorki. Zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie stężenia MDA do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. W grupach otrzymujących witaminę E – zarówno samą, jak i podawaną łącznie z metioniną – zaobserwowano podobne, wynoszące ok. 60%, obniżenie stężenia MDA w porównaniu z grupą otrzymującą wyłącznie NaF. Wydaje się jednak, że wynika to raczej z obecności witaminy E niż metioniny.

Hamowanie procesu peroksydacji lipidów pod wpływem suplementacji metioniną w narażeniu na fluorki obserwowali autorzy innych prac. Błaszczyk i wsp. zaobserwowali dla tej samej dawki statystycznie istotne obniżenie stężenia MDA w nerkach i krwi szczurów po podaniu metioniny [4,16]. Korzystny wpływ łącnego podawania witaminy E i metioniny potwierdzono także w innych badaniach u szczurów narażonych na

fluorki [17]. Autorzy tych prac wskazują, że taki efekt mógł spowodować wpływ metioniny na zwiększenie stężeń innych nieenzymatycznych antyoksydantów, np. liponianu czy koenzymu Q, lub pośrednio podczas redukcji sulfotlenku metioniny do metioniny w reakcji katalizowanej przez reduktazę sulfotlenku metioniny zależną od NADPH i tioredoksyny.

W niniejszym badaniu nie zaobserwowano takiego efektu. Wydaje się, że podawanie łączne witaminy E z metioniną skutkuje udziałem metioniny w regeneracji rodnika tokoferylowego, który odgrywa w tym synergistycznym układzie rolę zmiatacza RFT, hamując tym samym proces peroksydacji lipidów.

Ponieważ MDA jest miernikiem stresu oksydacyjnego, wzrost jego stężenia wpływa na zmianę enzymatycznego układu antyoksydacyjnego organizmu.

W niniejszym badaniu narażenie szczurów na fluor w stężeniu 10 mg/kg mc./24 godz. przez 35 dni mimo braku zmian aktywności całkowitej dysmutazy nadtlenkowej t-SOD spowodowało zmiany w aktywności jej izoenzymów. Zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie aktywności izoenzymu mitochondrialnego MnSOD (tab. 1) z równoczesnym statystycznie istotnym wzrostem aktywności CuZnSOD (ryc. 1) w grupach NaF+M+E i NaF+E. Uzyskane wyniki wskazują, że wywołany przez fluorki stres oksydacyjny może prowadzić do uszkodzenia mitochondriów, co może się przyczyniać do obniżenia aktywności izoenzymu mitochondrialnego. Wzrost aktywności izoenzymu cytoplazmatycznego pod wpływem zastosowanych substancji świadczy o ich korzystnej roli antyoksydacyjnej.

Aktywności peroksydazy glutationowej (GPX) i katalazy (CAT) były statystycznie istotnie niższe we wszystkich badanych grupach względem grupy kontrolnej (ryc. 2 i 3). Nie zaobserwowano także różnic między grupami otrzymującymi fluorki z metioniną i witaminą E lub samą witaminą E a grupą NaF.

Peroksydaza glutationowa wspólnie z katalazą kontrolują szybkość peroksydacji lipidów i chronią błony komórkowe przed uszkodzeniem peroksydacyjnym spowodowanym powstającymi RFT. Obserwowane w niniejszym badaniu zmiany świadczą o braku ochrony błon komórkowych przed uszkodzeniem peroksydacyjnym w warunkach eksperymentu. Sugeruje to, że zastosowany czas i dawka mogą w konsekwencji doprowadzić do zaburzenia aktywności SOD i poprzez nagromadzenie nadtlenku wodoru – do uszkodzeń oksydacyjnych organizmu. Równocześnie obserwowany brak zmian aktywności transferazy glutationowej (GST) i reduktazy glutationowej (GR) (tab. 1) potwierdza zaburzenie

enzymatycznego układu antyoksydacyjnego lub wyczerpanie jego potencjału.

Podobne wyniki uzyskali Birkner i wsp. [14]. Zaobserwowali oni wzrost stężenia MDA w homogenatach wątroby szczura z jednoczesnym obniżeniem aktywności GPX i brakiem zmian aktywności t-SOD, MnSOD, CuZnSOD i CAT podczas ekspozycji na fluor w dawce 4,9 mg F⁻/kg mc./24 godz. przez 50 dni. Również Birkner i wsp. w pracy oceniającej wpływ fluoru w dawce 3 mg F⁻/kg mc./24 godz. przez 12 tygodni nie stwierdzili statystycznie istotnego wzrostu aktywności w homogenatach wątroby królika t-SOD, CuZnSOD i GPX w grupie zwierząt otrzymujących NaF względem grupy kontrolnej. Równocześnie zaobserwowali wzrost stężenia MDA w grupie otrzymującej NaF [15]. Chlubka i wsp. także stwierdzili obniżenie aktywności GPX w homogenatach wątroby w grupach narażonych na fluorek sodu [18].

Wpływ fluorków na organizm jest jednak różny dla różnych tkanek.

Aydin i wsp. zaobserwowali wzrost aktywności t-SOD w surowicy szczurów otrzymujących 10 mg NaF/l wody pitnej przez 21 dni. Ci sami autorzy obserwowali równocześnie obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej (GPX) w homogetanach płuc [19]. Chinoy i Patel wykazali obniżenie aktywności t-SOD, GPX i CAT w tkance mózgowej zwierząt narażonych przez 30 dni na fluorek sodu w dawce 10 mg/kg mc./24 godz. Wyniki te korelowały z wysokim stężeniem produktów peroksydacji lipidów. Dodatek witamin C i E do diety odwracał te niekorzystne zmiany [20]. Również Vani i Reddy w badaniach prowadzonych na myszach otrzymujących NaF w dawce 20 mg/kg mc. przez 14 dni zaobserwowali obniżenie aktywności SOD, CAT i GST w mózgu oraz mięśni brzuchatym z równoczesną kumulacją fluoru w tych tkankach [21].

Wyniki badania histopatologicznego potwierdzają działanie ochronne zastosowanych antyoksydantów na wątrobę szczurów. Wyraża się ono przeciwdziałaniem zmianom morfologicznym powstającym przy narażeniu na fluorek sodu. Wyniki te wykazują korelację z wynikami badań biochemicznych, w których stwierdzono korzystny wpływ witaminy E i metioniny na stres oksydacyjny.

Podobny do przedstawionego w niniejszej pracy efekt działania nieenzymatycznych antyoksydantów na stres oksydacyjny wywołany narażeniem na fluorki wykazali inni autorzy.

Grucka-Mamczar i wsp. opisali korzystny wpływ diety suplementowanej witaminami A, C, E oraz koenzymem Q

i liponianem w różnych kombinacjach na stężenie MDA w surowicy szczurów narażonych na fluorek sodu w dawce 10 mg/kg mc. przez 24 godz. Najsilniejsze działanie ochronne zaobserwowano po wzbogaceniu diety o koenzym Q oraz witaminy A i E [22].

Stawiarska-Pięta i wsp. wykazali korzystny wpływ witamin A i E podawanych łącznie z koenzymem Q w zapobieganiu zmianom morfologicznym płuc i trzustki szczurów narażonych na fluorek sodu [23]. W innych badaniach prowadzonych na szczurach ci sami autorzy wykazali korzystny wpływ witaminy E i metioniny na aktywność enzymów przemian węglowodanowych oraz enzymów związanych z przemianami glutationu. Zaobserwowali także ustąpienie zmian patomorfologicznych widocznych w wątrobie przy narażeniu zwierząt na jony fluorkowe [24].

W niniejszym badaniu po 35-dniowym narażeniu zwierząt na fluorki wysokiemu stężeniu MDA w grupie NaF odpowiadała niska aktywność t-SOD, CAT i GPX. Świadczy to o braku równowagi między układem pro- i antyoksydacyjnym w warunkach przeprowadzonego eksperymentu.

Uwzględniając badania innych autorów, można stwierdzić, że efekt działania fluorków na organizm zależy od zastosowanej dawki, czasu trwania eksperymentu i badanych narządów, jak również zastosowania różnych substancji antyoksydacyjnych.

WNIOSKI

Narażenie zwierząt na fluorki w dawce 10 mg F⁻/kg mc./24 godz. przez 35 dni prowadzi do wyczerpania enzymatycznej ochrony antyoksydacyjnej w wątrobie, obserwowanej poprzez obniżenie aktywności CAT i GPX z jednoczesnym wzrostem stężenia MDA. Dodatek witaminy E i metioniny nie indukuje wzrostu aktywności enzymów antyoksydacyjnych za wyjątkiem CuZnSOD, co może świadczyć o znacznym uszkodzeniu mitochondriów wątroby na skutek wzmożonej syntezy RFT. Zastosowane substancje wpływają jednak korzystnie na obniżenie stężenia MDA w komórkach wątrobowych.

Biorąc pod uwagę wyniki niniejszego badania, jak również prace innych autorów, wydaje się, że bardzo ważnym mechanizmem toksycznego działania fluorków jest uszkodzenie bariery antyoksydacyjnej organizmu, zaburzenie homeostazy i jego wpływ na powstanie stresu oksydacyjnego prowadzącego do upośledzenia czynności różnych tkanek, w szczególności wątroby.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Paniom Technik Ewie Chwalińskiej i Edycie Hudziec z Katedry i Zakładu Biochemii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego za pomoc w oznaczeniach biochemicznych oraz Pani dr hab. Barbarze Stawiarskiej-Pięcie z Katedry i Zakładu Patologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu za wykonanie preparatów i ich ocenę patomorfologiczną.

PIŚMIENNICTWO

1. Jakubowski M.: Fluorki – w przeliczeniu na F. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podst. Metod. Ocen. Środow. Pr. 2008;3(57):25–50
2. Sun L., Gao Y, Zhang W., Liu H., Sun D.: Effect of high fluoride and high fat on serum lipid levels and oxidative stress in rabbits. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2014;38:1000–1006, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.10.010>
3. Birkner E., Zalejska-Fiolka J., Kasperczyk A., Kasperczyk S., Grucka-Mamczar E., Stawiarska-Pięta B. i wsp.: The influence of methionine, selenomethionine, and vitamin E on liver metabolic pathways and steatosis in high-cholesterol fed rabbits. Biol. Trace Elem. Res. 2001;20:179–194
4. Błaszczyk I., Grucka-Mamczar E., Kasperczyk S., Birkner E.: Influence of methionine upon the concentration of malondialdehyde in the tissues and blood of rats exposed to sodium fluoride. Biol. Trace Elem. Res. 2009;129(1–3): 229–238, <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8308-3>
5. Richterich R.: Chemia kliniczna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1971
6. Oyanagui Y.: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Annal. Biochem. 1984;142:290–296, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90467-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90467-6)
7. Paglia D.E., Valentine W.N.: Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 1967;70:158–169
8. Habig W.H., Jakoby W.B.: Assays for differentiation of glutathione S-transferases. Methods Enzymol. 1981;77:398–405, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8)
9. Aebi H.: Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 1984;105: 121–126, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
10. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Annal. Biochem. 1979;95:351–358, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
11. Zawistowski S.: Technika histologiczna. Histologia oraz podstawy histopatologii. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996, ss. 58–126
12. Kłodka D., Telesiński A., Bońkowski M.: Określenie zależności pomiędzy zawartością fluoru oraz wybranych witamin w naparach różnych rodzajów herbat. Bromat. Chem. Toksykol. 2008;4:957–963
13. Bąk M., Kicińska-Krogulska M., Czerniak P.: Toksyczne uszkodzenie wątroby – współczesny pogląd na etiopatogenezę. Część II. Med. Pr. 2011;62(2):203–210
14. Birkner E., Grucka-Mamczar E., Zalejska-Fiolka J., Chlubek D., Kasperczyk S., Stawiarska-Pięta B. i wsp.: The influence of sodium fluoride and caffeine on the activity of antioxidative enzymes and the concentration of malondialdehyde in rat liver. Fluoride 2009;42:105–109, <https://doi.org/10.1385/BTER:112:2:169>
15. Birkner E., Grucka-Mamczar E., Stawiarska-Pięta B., Birkner K., Zalejska-Fiolka J., Kasperczyk S. i wsp.: The influence of rich-in-cholesterol diet and fluoride ions contained in potable water upon the concentration of malondialdehyde and the activity of selected antioxidative enzymes in rabbit liver. Biol. Trace Elem. Res. 2009;129(1–3):137–142, <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8306-5>
16. Błaszczyk I., Grucka-Mamczar E., Kasperczyk S., Birkner E.: Influence of methionine upon the activity of antioxidative enzymes in the kidney of rats expose to sodium fluoride. Biol. Trace Elem. Res. 2010;133(1):60–70, <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8412-z>
17. Błaszczyk I., Grucka-Mamczar E., Kasperczyk S., Birkner E.: Influence of fluoride on rat kidney antioxidant system: Effects of methionine and vitamin E. Biol. Trace Elem. Res. 2008;121(1):51–59, <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8030-6>
18. Chlubek D., Stachowska E., Bober J.: Udział fluorków w reakcjach wolnorodnikowych i ich wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Bromat. Chem. Toksykol. 2001;3:263–266
19. Aydin G., Cicek E., Akdogan M., Gokalp O.: Histopathological and biochemical changes in lung tissues of rats following administration of fluoride over several generations. J. Appl. Toxicol. 2003;23:437–446, <https://doi.org/10.1002/jat.935>
20. Chinoy N.J., Patel T.N.: The influence of fluoride and/or aluminum on free radical toxicity in the brain of female mice and beneficial effects of some antidotes. Fluoride 2000;33:8
21. Vani M.L., Reddy K.P.: Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. Fluoride 2000;33:17–26
22. Grucka-Mamczar E., Birkner E., Błaszczyk I., Kasperczyk S., Wielkoszyński T., Świętochowska E. i wsp.: The influence of sodium fluoride and antioxidants on the concentration of malondialdehyde in rat blood plasma. Fluoride 2009;2:101–104

23. Stawiarska-Pięta B., Paszczela A., Grucka-Mamczar E., Szaflarska-Stojko E., Birkner E.: The effect of antioxidative vitamins A and E and coenzyme Q on the morphological picture of the lungs and pancreata of rats intoxicated with sodium fluoride. *Food Chem. Toxicol.* 2009;47:2544–2550, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.015>
24. Stawiarska-Pięta B., Bielec B., Birkner K., Birkner E.: The influence of vitamin E and methionine on the activity of enzymes and the morphological picture of liver of rats intoxicated with sodium fluoride. *Food Chem. Toxicol.* 2012;50:972–978, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.014>