

INFLUENCE OF SELECTED ALCOHOLS ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN RAT LUNGS

Agnieszka P. JURCZYK, Maciej BARZDO, Beata JANKOWSKA,
Ewa MEISSNER, Jarosław BERENT, Krzysztof KORDEL, Stefan SZRAM
Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University, Łódź

ABSTRACT: This paper presents the results of research on the influence of chronic intoxication with selected alcohols (ethanol, methanol, and ethylene glycol) on certain oxidative stress parameters in rat lungs. From these results it may be concluded that chronic intake of alcohol produces an increase in the concentration of reactive oxygen forms (hydrogen peroxide) and lipid peroxidation products (TBA-reactive products), and also changes in the concentration of antioxidant system components (free SH-groups) in this organ.

KEY WORDS: Ethanol; Methanol; Ethylene glycol; Oxidative stress.

Problems of Forensic Sciences, vol. LV, 2003, 50–59
Received 3 November 2003; accepted 1 December 2003

INTRODUCTION

In the course of metabolism of alcohols, including ethanol, methanol, and ethylene glycol, reactive forms of oxygen are generated [11]. This leads to the development of oxidative stress, i.e. to a disturbance in the homeostasis of the organism, leading to an increase in stationary concentrations of reactive forms of oxygen. Their concentration depends on the equilibrium level between their rate of formation and the concentration of low molecular antioxidants and also the activity of protecting enzymes. An increase in the formation rate of the reactive oxygen forms, for example, as a result of xenobiotic action, or insufficient activity of defense mechanisms leads to intensification of processes damaging numerous cell constituents – lipid membranes (lipid peroxidation) [4, 6], nucleic acids, and proteins. Lipid peroxidation is a multi-stage process, in which unsaturated fatty acids and other lipids are oxidised. These products are less reactive than the reactive oxygen forms and therefore they can move a considerable distance in a cell and act as secondary transmitters of cellular damage [14], reacting with thiol and amino groups of proteins, lipids, amino carbohydrates, and nitrogen bases of nucleic acids. The reactions between the reactive oxygen forms and proteins result in modification of

amino acid radicals and prosthetic groups and aggregation or fragmentation of protein molecules.

The mediator of this molecular damage is usually a hydrocarbon radical, but some modifications, such as SH-groups oxidation, can be caused by a superoxide anion-radical and hydrogen peroxide simultaneously [2, 13].

Intoxications caused by ethanol can be acute or chronic. Consumption of ethanol, especially habitual intake, has a toxic influence on many organs, among others, the liver and lungs. While the effect of ethanol on liver diseases has been broadly studied, the relationship between respiratory system diseases and alcohol abuse is not completely clear. Respiratory system diseases, such as chronic bronchitis, chronic obstructive lung disease, pulmonary fibrosis, pulmonary emphysema etc., occur more frequently in heavy drinkers than in teetotalers or occasional drinkers [7]. In such cases, the aetiology of these chronic diseases is probably multifactorial – smoking, nutritional deficiencies etc. [1, 8, 10]. However, the importance of ethanol in the development of lung damage, with regard to oxidative stress, may be significant. One ought to remember that the alveolar cells are in steady contact with oxygen and therefore are exposed to generation of reactive oxygen forms with ethanol participation to a greater degree than other organs [3]. There are also reports suggesting that administration of antioxidants to animals that have been subjected to long-term ethanol treatment reduces the extent of respiratory system damage [5].

Intoxications caused by non-consumable alcohols are usually acute poisonings. In persons chronically abusing alcohol, such poisonings may occur frequently. Repeated intoxications with non-consumable alcohols, usually consumed together with ethanol, can contribute to the development of various diseases, including diseases of the respiratory system [9, 12].

THE AIM OF THE RESEARCH

The aim of the research was to define the influence of chronic intoxication by ethanol, methanol, and ethylene glycol on oxidative stress parameters in rat lungs.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted on 135 male Lewis rats, aged 6 months, with a body mass between 180 and 250 g. The animals were divided into experimental groups composed of 30 specimens each; the control group numbered 15 animals. The experimental groups were given 1-molar ethanol solu-

tion, 1-molar methanol solution, and 1- or 0.25-molar ethylene glycol solution respectively. The control group received tap water. The animals had free access to the beverages. Each group was divided into 3 subgroups, which were killed after 4, 8, and 12 weeks of intoxication respectively, except for the animals that received 1-molar solution of ethylene glycol, which were all killed after 4 weeks due to the high toxicity of the ethylene glycol. The animal lungs, taken during autopsy, were exposed to perfusion with cold isotonic salt solution, frozen at a temperature of -80°C and subjected to further examinations.

Assessment of the oxidative stress in lungs encompassed:

1. Measurement of the concentration of TBA-reactive products (the end-products of lipid peroxidation, reacting with thiobarbituric acid) by spectrofluorimetry (using a Perkin Elmer LS 50B spectrofluorimeter);
2. Measurement of the hydrogen peroxide concentration by spectrofluorimetry with the use of homovanillic acid and horseradish peroxidase (using a Perkin Elmer LS 50B spectrofluorimeter);
3. Measurement of soluble SH-groups concentration by spectrophotometry with the use of Elman solvent (using an Ultrospec 2000 spectrophotometer).

The above parameters of oxidative stress were presented in the form of conversion to the protein quantity, as determined by the Lowry method.

The authors received the consent of the University Committee for Scientific Research Ethics to conduct the research.

RESULTS AND DISCUSSION

Compared to the control group, a distinct, statistically significant increase in the concentration of TBA-reactive compounds in all the examined groups was noticed, which indicates an intensification of lipid peroxidation processes in lungs in the course of intoxication by respective alcohols (Figure 1, Table I).

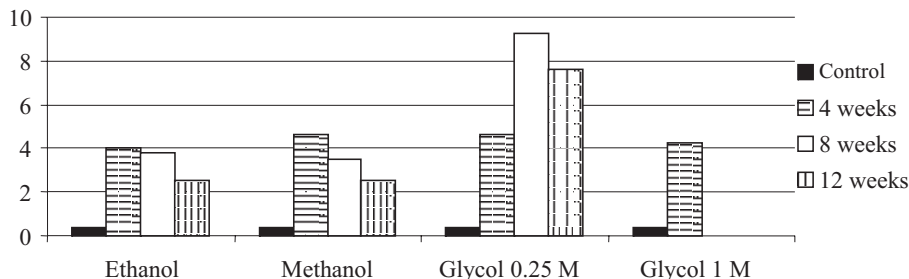


Fig. 1. Changes of the TBA-reactive compounds concentration in lungs in the course of the intoxication with the relative alcohols ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein).

TABLE I. THE STATISTICAL SIGNIFICANCE OF CHANGES OF THE TBA-REACTIVE COMPOUNDS CONCENTRATION

Alcohol	Time of the intoxication		
	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Ethanol	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Methanol	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Glycol 0.25 M	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Glycol 1 M	$p < 0.001$	–	–

ns – no statistical significance.

An increase in the concentration of hydrogen peroxide in all the examined groups, compared to the control group, was noticed, although the results obtained in the 12th week of intoxication with ethanol, in the 4th week of intoxication with methanol, and in the 4th and 8th week of intoxication with 0.25-molar ethylene glycol solution did not show statistical significance. The increase in the concentration of hydrogen peroxide attests to an intensification in generation of reactive oxygen forms in the lungs (Figure 2, Table II).

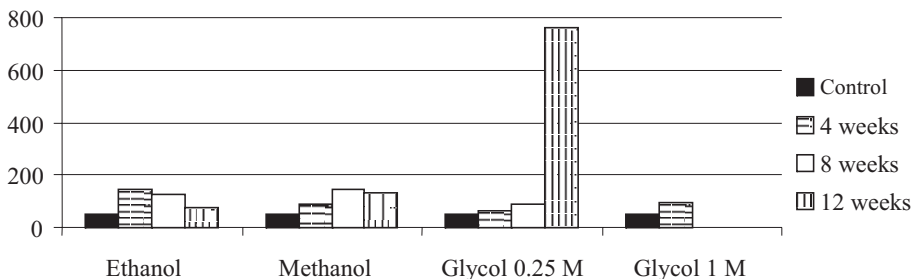


Fig. 2. Changes of the hydrogen peroxide concentration in lungs in the course of the intoxication with the relative alcohols ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein).

TABLE II. THE STATISTICAL SIGNIFICANCE OF CHANGES OF THE HYDROGEN PEROXIDE CONCENTRATION

Alcohol	Time of the intoxication		
	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Ethanol	$p < 0.05$	$p < 0.05$	ns
Methanol	ns	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Glycol 0.25 M	ns	ns	$p < 0.01$
Glycol 1 M	$p < 0.05$	–	–

ns – no statistical significance.

Changes in concentrations of free SH-groups in lungs varied. An increase in concentration of free SH-groups occurred in the course of intoxication with ethanol, methanol, and 1-molar ethylene glycol solution. A statistically significant increase appeared in the 4th week of intoxication with ethanol and methanol, and in the 8th week of intoxication with 0.25-molar ethylene glycol solution. The rats intoxicated with 0.25-molar ethylene glycol solution, however, showed a decrease in the free SH-groups concentration in the lungs, but it was statistically significant only in the 8th week of intoxication. An increase in the SH-groups concentration may result from an intensification of activity of the defence mechanisms of the organism, whereas a concentration decrease may be a consequence of increased consumption of these groups during antioxidant processes (Figure 3, Table III).

TABLE III. THE STATISTICAL SIGNIFICANCE OF CHANGES OF THE FREE SH-GROUPS CONCENTRATION

Alcohol	Time of the intoxication		
	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Ethanol	$p < 0.01$	ns	ns
Methanol	$p < 0.001$	ns	ns
Glycol 0.25 M	ns	$p < 0.01$	ns

ns – no statistical significance.

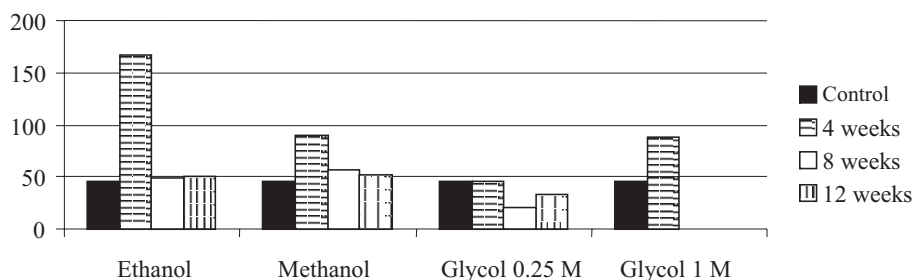


Fig. 3. Changes of the free SH-groups concentration in lungs in the course of the intoxication with the relative alcohols ($\mu\text{mol/mg}$ of protein).

CONCLUSIONS

1. In the course of intoxication with ethanol, methanol, and ethylene glycol, a statistically significant increase in the concentration of TBA-reactive compounds in rat lungs was noticed in all the examined groups (compared to the control group).

2. Ethanol, methanol, and ethylene glycol caused an increase in the concentration of hydrogen peroxide in rat lungs in all the examined groups (compared to the control group). However, the increase was not statistically significant in the 12th week of the intoxication with ethanol, in the 4th week of intoxication with methanol, and in the 4th and 8th week of intoxication with 0.25-molar ethylene glycol solution.
3. The intoxication of rats with ethanol, methanol, and ethylene glycol caused changes in concentrations of free SH-groups in the lungs. Some examined subgroups showed an increase and others a decrease in the concentration of this factor. An increase in the free SH-groups concentration was noticed in the case of intoxication with ethanol, methanol, and 1-molar ethylene glycol solution. A statistically significant increase appeared in the 4th week of intoxication with ethanol and methanol, and in the 8th week of intoxication with 0.25-molar. The rats intoxicated with 0.25-molar ethylene glycol solution showed a decrease in the free SH-groups concentration in lungs, having statistical significance, however, only in the 8th week of the intoxication.

References:

1. Antczak A., Nowak D., Shariati B. [et al.], Increased hydrogen peroxide and TBA-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients, *European Respiratory Journal* 1887, vol. 10, pp. 1235–1241.
2. Barry H., Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker?, *Free Radical Biology and Medicine* 2002, vol. 32, pp. 968–974.
3. Burch G. E., De Pasquale N. P., Alcoholic lung disease. An hypothesis, *American Heart Journal* 1967, vol. 73, pp. 147–148.
4. Cakatay U., Telci A., Kayali R. [et al.], Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle, *Clinical Biochemistry* 2003, vol. 36, pp. 51–55.
5. El-Sokkary G. H., Reiter R. J., Tan D. X. [et al.], Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration, *Alcohol and Alcoholism* 1999, vol. 34, pp. 842–850.
6. Koken T., Serteser M., Kahraman A. [et al.], Oxidative stress markers in hepatitis C infected hemodialysis patients, *Journal of Nephrology* 2002, vol. 15, pp. 302–307.
7. Krumpke P. E., Commiskey J. M., Lillington G. A., Alcohol and the respiratory tract, *Medical Clinics of North America* 1984, vol. 68, pp. 201–219.
8. Nowak D., Antczak A., Król M. [et al.], Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers, *European Respiratory Journal* 1996, vol. 9, pp. 652–657.
9. Perez R., Lopez M., Baja G., Aging and lung antioxidant enzymes glutathione and lipid peroxidation in the rat, *Free Radical Biology and Medicine* 1991, vol. 10, pp. 35–39.

10. Piotrowski W., Marczak J., Kurmanowska Z., Production of hydrogen peroxide by cells of alveolar epithelium, *Current Pneumology* 1998, vol. 2, pp. 49–52.
11. Rybczyńska M., Biochemiczne podstawy wolnorodnikowego uszkodzenia tkanek, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 1994, t. 48, s. 419–442.
12. Ryreldt A., Bannenberg G., Moldeus P., Free radicals and lung disease, *British Medical Bulletin* 1993, vol. 3, pp. 588–603.
13. Soszynski M., Bartosz G., Decrease in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins, *Free Radical Biology and Medicine* 1997, vol. 23, pp. 463–469.
14. Yagi K., Lipid peroxides and human diseases, *Chemistry and Physics of Lipids* 1987, vol. 45, pp. 337–351.

WPLYW WYBRANYCH ALKOHOLI NA PARAMETRY STRESU OKSYDACYJNEGO W PŁUCACH SZCZURÓW

Agnieszka P. JURCZYK, Maciej BARZDO, Beata JANKOWSKA,
Ewa MEISSNER, Jarosław BERENT, Krzysztof KORDEL, Stefan SZRAM

WPROWADZENIE

W toku metabolizmu alkoholi, w tym etanolu, metanolu i glikolu etylenowego, generowane są reaktywne formy tlenu – RFT [11]. Prowadzi to do rozwoju stresu oksydacyjnego, czyli zaburzenia homeostazy organizmu powodującego podwyższenie stacjonarnych stężeń reaktywnych form tlenu. Stężenie to zależy od poziomu równowagi pomiędzy szybkością ich wytwarzania a stężeniem antyoksydantów niskocząsteczkowych oraz aktywnością enzymów ochronnych. Zwiększenie szybkości wytwarzania reaktywnych form tlenu, np. w wyniku działania ksenobiotyków, bądź niedostateczna aktywność mechanizmów obronnych, prowadzą do wzmożenia procesów uszkadzających liczne składniki komórkowe – błony lipidowe (peroksydacja lipidów) [4, 6], kwasy nukleinowe i białka.

Peroksydacja lipidów jest wieloetapowym procesem, w którym następuje utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych i innych lipidów. Produkty te są mniej reaktywne niż RFT i dzięki temu mogą przemieszczać się w komórce na znaczną odległość i pełnić rolę wtórnych przekaźników uszkodzeń [14], reagując z grupami tiolowymi oraz z aminowymi białek, lipidów, aminocukrów i zasad azotowych kwasów nukleinowych. Reakcje RFT z białkami prowadzą do modyfikacji reszt aminokwasowych i grup prostetycznych oraz agregacji lub fragmentacji cząsteczek białkowych.

Mediatorem tych molekularnych uszkodzeń jest zazwyczaj rodnik wodorotlenowy, ale niektóre modyfikacje, takie jak utlenianie grup –SH, mogą być wywoływane równocześnie przez anionorodnik nadadtlenkowy i nadtlenek wodoru [2, 13].

Zatrucia etanolem mają zarówno charakter zatruć ostrych, jak i przewlekłych. Spożywanie etanolu, zwłaszcza przewlekłe, wywiera toksyczny wpływ na wiele narządów, m.in. wątrobę i płuca. O ile wpływ etanolu na choroby wątroby jest szeroko zbadany, o tyle związek chorób układu oddechowego z nadużywaniem alkoholu nie jest w pełni jasny. Choroby układu oddechowego, takie jak przewlekłe zapalenie oskrzeli, przewlekła obturacyjna choroba płuc, zwłóknienie płuc, rozedma itp. występują częściej u alkoholików niż u abstynentów bądź osób sporadycznie spożywających alkohol [7]. Prawdopodobnie etiologia tych schorzeń, w takich przypadkach, jest wieloczynnikowa – palenie tytoniu, niedobory pokarmowe itp. [1, 8, 10]. Jednakże znaczenie etanolu w rozwoju uszkodzeń płuc, w aspekcie stresu oksydacyjnego, może być istotne. Należy pamiętać, że komórki pęcherzyków płucnych mają stały kontakt z tlenem i w związku z tym są narażone na generowanie reaktywnych form tlenu z udziałem etanolu w większym stopniu niż inne narządy [3]. Istnieją również doniesienia sugerujące, że podawanie antyoksydantów zmniejsza stopień uszkodzenia układu oddechowego u zwierząt, którym przez długi czas podawano etanol [5].

Zatrucia alkoholami niekonsumpcyjnymi zazwyczaj mają charakter zatruć ostrych. U osób przewlekle nadużywających alkoholu zatrucia takimi alkoholami mogą się wielokrotnie powtarzać. Częste intoksykacje alkoholami niekonsumpcyjnymi, zwykle spożywanymi łącznie z etanolem, mogą przyczynić się do rozwoju różnych chorób, również chorób układu oddechowego [9, 12].

CEL PRACY

Celem pracy było określenie wpływu przewlekłej intoksykacji etanolem, metanolem i glikolem etylenowym na parametry stresu oksydacyjnego w płucach szczurów.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 135 szczurach ze szczepu wsobnego lewis, samcach, w wieku 6 miesięcy, o masie ciała od 180 do 250 g. Zwierzęta podzielono na grupy doświadczalne liczące po 30 sztuk; grupa porównawcza liczyła 15 sztuk. Grupy doświadczalne otrzymywały do picia odpowiednio 1-molowy roztwór etanolu, 1-molowy metanolu oraz 1- bądź 0,25-molowy roztwór glikolu etylenowego. Grupa porównawcza otrzymywała wodę wodociagową. Zwierzęta miały swobodny dostęp do płynów. Każda grupa została podzielona na 3 podgrupy, które były uśmiercane odpowiednio po 4, 8 i 12 tygodniach intoksykacji, zaś zwierzęta otrzymujące 1-molowy roztwór glikolu etylenowego, z uwagi na znaczną jego toksyczność, po 4 tygodniach. Pobrane podczas sekcji zwierząt płuca perfundowano zimnym roztworem soli fizjologicznej, zamrażano w temperaturze -80°C i poddawano dalszym badaniom.

Ocena stresu oksydacyjnego w płucach obejmowała:

1. pomiar stężenia produktów TBA-reaktywnych (końcowych produktów peroksydacji lipidów, reagujących z kwasem tiobarbiturowym) metodą spektrofлуorymetryczną (spektrofлуorymetr LS 50B firmy Perkin Elmer);
2. pomiar stężenia nadtlenu wodoru metodą spektrofлуorymetryczną z użyciem kwasu homowalinowego i peroksydazy chrzanowej (spektrofлуorymetr LS 50B firmy Perkin Elmer);
3. pomiar stężenia rozpuszczalnych grup $-SH$ metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika Elmmana (spektrofotometr Ultrospec 2000).

Powyższe parametry stresu oksydacyjnego zostały podane w przeliczeniu na ilość białka oznaczonego metodą Lowry'ego.

Na przeprowadzenie powyższych badań autorzy otrzymali zgodę Uczelnianej Komisji Etyki Badań Naukowych.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zaobserwowano wyraźny, istotny statystycznie wzrost stężeń związków TBA-reaktywnych we wszystkich badanych grupach w stosunku do grupy porównawczej, co wskazuje na nasilenie procesów peroksydacji lipidów w płucach w przebiegu intoksykacji poszczególnymi alkoholami (rycina 1, tabela D).

Zaobserwowano wzrost stężenia nadtlenu wodoru we wszystkich badanych grupach w stosunku do grupy porównawczej, chociaż w 12 tygodniu intoksykacji etano-

lem, w 4 tygodniu intoksykacji metanolem oraz w 4 i 8 tygodniu intoksykacji 0,25-molowym roztworem glikolu etylenowego uzyskane dane nie wykazywały istotności statystycznej. Wzrost stężenia nadtlenu wodoru świadczył o nasileniu generacji reaktywnych form tlenu w płucach (rycina 2, tabela II).

Zmiany stężeń wolnych grup –SH w płucach były różne. Wzrost stężenia wolnych grup –SH wystąpił w przypadku intoksykacji etanolem, metanolem i 1-molowym roztworem glikolu etylenowego, przy czym istotny statystycznie wzrost miał miejsce w 4 tygodniu intoksykacji etanolem i metanolem oraz w 8 tygodniu intoksykacji 0,25-molowym roztworem glikolu etylenowego. U szczurów intoksykowanych 0,25-molowym roztworem glikolu etylenowego wystąpił natomiast spadek stężenia wolnych grup –SH w płucach, z tym, że był on istotny statystycznie tylko w 8 tygodniu intoksykacji. Wzrost stężeń grup –SH mógł wynikać z nasilonej aktywności mechanizmów obronnych organizmu, zaś spadek tych stężeń mógł być następstwem zwiększonego zużycia tych grup w przebiegu procesów antyoksydacyjnych (rycina 3, tabela III).

WNIOSKI

1. W przebiegu intoksykacji etanolem, metanolem i glikolem etylenowym zaobserwowano we wszystkich badanych grupach istotny statystycznie wzrost (w stosunku do grupy porównawczej) stężeń związków TBA-reaktywnych w płucach szczurów.
2. Etanol, metanol i glikol etylenowy powodowały wzrost (w stosunku do grupy porównawczej) stężenia nadtlenu wodoru w płucach szczurów we wszystkich badanych grupach, jednakże w 12 tygodniu intoksykacji etanolem, 4 tygodniu intoksykacji metanolem oraz w 4 i 8 tygodniu intoksykacji 0,25-molowym roztworem glikolu etylenowego nie wykazywał on istotności statystycznej.
3. Intoksykacja szczurów etanolem, metanolem i glikolem etylenowym wywoływała zmiany stężeń wolnych grup –SH w płucach. W niektórych badanych podgrupach wystąpił wzrost, a w innych spadek stężenia tego czynnika. Wzrost stężenia wolnych grup –SH obserwowano w przypadku intoksykacji etanolem, metanolem i 1-molowym roztworem glikolu etylenowego, przy czym istotny statystycznie wzrost stężeń miał miejsce w 4 tygodniu intoksykacji etanolem i metanolem oraz w 8 tygodniu intoksykacji 0,25-molowym roztworem glikolu etylenowego. U szczurów intoksykowanych 0,25-molowym roztworem glikolu etylenowego doszło do spadku stężenia wolnych grup –SH w płucach, z tym, że był on istotny statystycznie tylko w 8 tygodniu intoksykacji.