



ANALYSIS OF SELECTED PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS AND THE ANTIOXIDATION SYSTEM IN HEART HOMOGENATES AND BLOOD IN EXPERIMENTAL CHRONIC INTOXICATION WITH ETHANOL

Ewa MEISSNER¹, Maciej BARZDO¹, Agnieszka P. JURCZYK¹, Beata JANKOWSKA¹,
Dariusz NOWAK², Jarosław BERENT¹, Leszek MARKUSZEWSKI¹, Stefan SZRAM¹

¹ *Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University, Łódź*

² *Chair and Department Experimental and Clinical Physiology, Medical University, Łódź*

Abstract

Metabolism of alcohols, including ethanol, generates oxidation stress. The undertaken investigations aimed at following changes in the oxidation-antioxidation balance in the heart and blood of rats chronically intoxicated with 1 M ethanol solution. The study was performed on 30 male Lewis rats, aged around 6 months (240–290 g) receiving ethanol for 4, 8 and 12 weeks. Ten rats that were given tap water constituted a control group. At the 8th week of intoxication with ethanol, a nearly three-fold increase in thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) concentration in heart homogenates was observed compared to controls and the 4-week group. At the 12th week of the experiment there was a decrease in TBARs concentration in comparison with the concentration in the 8th week. Biochemical investigations revealed an elevation of TBARs concentration in erythrocytes of rats chronically intoxicated with ethanol at each time interval (4, 8, 12 weeks) in relation to the control group. At the 4th week of intoxication, a rise in hydrogen peroxide in myocardium homogenate was found along with a declined concentration of free thiol group as compared to the control group. During rat intoxication with 1 M ethanol there was an observed increase in catalase activity at the 4th week of the experiment. In the 8th week, this activity dropped to values lower than in the controls. At the 12th week, the catalase activity was elevated as compared to the 8th week, but was still lower than the control value. The peroxide dismutase activity was decreased in comparison with the control group.

Key words

Lipid peroxidation; Ethanol, Dismutase; Catalase; Hydrogen peroxide; Free SH groups.

Received 23 November 2005; accepted 30 December 2005

1. Introduction

Ethanol, an ingredient of alcoholic beverages, is widely consumed. Its toxic effects are mainly depressive on the central nervous system and it is a strong metabolic poison. Longer term intake results in hepatocellular, cardio-vascular, digestive system damage, and damage within the respiratory system. Metabolism of ethanol produces acetic aldehyde, free radicals, hy-

drogen peroxide and products of lipid peroxidation, which generate DNA damage.

Ethanol is one of the factors which induce formation of reactive oxygen species (ROS). The role of ethanol with respect to ROS is equivocal. In regard to oxygen stress, ethanol can induce bidirectional effects – on the one hand, it can generate reactive forms of oxygen, on the other it exhibits an antioxidant effect, as a so-called scavenger of the hydroxide radical [2, 6].

Prolonged abuse of ethyl alcohol leads to damage to the myocardium and skeletal muscles [8, 17, 23].

Reactive forms of oxygen (ROS) are oxygen derivatives which, having one or more unpaired electrons in the outer orbital, are known as free radicals, for example: the hydroperoxide radical ($\text{HO}_2\cdot$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), anionic radical superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), and also those which do not have these kinds of electrons, e.g. hydrogen peroxide (H_2O_2) [2].

The effect of ROS on cells and their components can be peroxidation of lipids of the membrane, oxidation of macromolecular compounds (glutathione, ascorbate), fracture of the DNA thread, damage to DNA nucleobases, chromosome damage, inhibition of oxidative phosphorylation in mitochondria, generating mutations and cancerous transformation of cells.

Peroxidation of lipids is the best known biological process involving free radicals, in which unsaturated lipid acids and other lipids are oxidised, and also peroxides of these compounds are created. TBARs (compounds which react with thiobarbituric acid) are products of this process, (MDA) malondialdehyde being one of them.

There are defensive mechanisms in aerobic organisms that protect them from the toxic effects of oxygen. These mechanisms are related to the presence of various compounds with a variety of biological mechanisms in cytosol, in organelles, in the cell membrane and systemic fluids. Enzymatic and non-enzymatic compounds which protect against the toxic effects of free radicals can be found in cytosol and mitochondria [15, 22]. The best known are: super oxide dismutase (SOD), catalase and peroxidase. Super oxide dismutase catalyses transformation of anionic radical superoxide to hydroperoxide and molecular oxygen. Catalases break down hydroperoxide to water and oxygen, peroxidases are enzymes which also eliminate hydrogen peroxide.

2. Aim of the research

The aim of this research was to evaluate the increase in peroxidation of lipids in cardiac homogenates and in red blood cells by measuring the concentration of substances that react with thiobarbituric acid (TBARs), evaluate the amount of hydrogen peroxide generation in cardiac homogenates, evaluate the response strength of the antioxidation system in the heart and in intoxicated animal blood by measuring the concentration of free $-\text{SH}$ groups in homogenates and the activity of catalase enzymes and superoxide dismutase in erythrocytes.

3. Materials and methods

The experiment was conducted on 240–290 g male inbred Lewis rats aged about 6 months. 30 rats were used, which were divided into three equal groups, each receiving 1 M of ethyl alcohol solution. Rats were killed in the 4th, 8th, and 12th week of the experiment by opening the chest (anesthetized with verbutal, 30 mg/kg, ip.). The control group consisted of 10 rats that had water to drink. During the experiment, there were 5 animals per cage, with free access to food (Murigran granulated fodder) and the temperature was maintained at 20°C. Blood was collected at the autopsy from the animal's heart into a test tube with EDTA anticoagulant. The erythrocyte mass was rinsed three times with 4°C, 0.9% NaCl solution at a volume ratio of 1:2 and frozen at a temperature of -20°C for further research. The activity of super peroxide dismutase (CuZn-SOD) was assayed by the Misra and Fridovich method [16], and that of catalase (CAT) with the Beers and Sizer method [3]. The concentration of TBARs in erythrocytes was assayed by the Placer et al. method [19].

After removing sections for electron and light microscopy, the heart was stored at -80°C till homogenates were made. The concentration of TBA-reactive products was determined by the spectrofluorometric method [26], the amount of hydroperoxide generated from organic homogenates by the spectrofluorometric method with homovanillic acid and horseradish peroxidase, while the concentration of dissolvable $-\text{SH}$ groups with Ellman's method.

All the described methods were approved by the Local Ethical Commission in Łódź for Animal Experiments (No. Ł/BD/53, 22.05.2001).

Statistical analysis was based on parametric tests (Student's t-test for small groups with $p < 0.05$ confidence interval) after normality of distribution was tested – using the Kolmogorov-Smirnov test with the Lillieforse modification. For multiple comparisons, analysis of ANOVA variances was used. In order to select an appropriate test for the data, the Shapiro-Wilk test was applied. If the distribution was not normal, then the U Mann-Whitney, a non-parametric test, was used. Calculations were carried out with Statistica[®] software.

4. Results

In the 8th week of ethyl alcohol intoxication, an almost threefold increase in TBARs in cardiac muscle homogenate compared to the control group and a sta-

tistically significant increase compared to the 4-week group were observed. However, in the 12th week of the experiment, the concentration of TBARs dropped by almost 2 times compared to the concentration in the 8th week (Table I).

Conducted biochemical tests revealed an increase in concentrations of lipid peroxidation products (calculated per gram haemoglobin) in red cells of chronically ethanol intoxicated rats at every time interval (in 4th, 8th, 12th week) compared to the appropriate control group (Table II).

control) was observed. The differences in the other groups were statistically insignificant (Table III).

In the 4th week of the experiment, a decrease in the concentration of free thiol groups compared to the control group was observed. No such differences were observed between other groups and the control group in the 8th and 12th week of intoxication (Table IV).

In the 4th week of the experiment, during the intoxication of rats with 1 M ethanol, a statistically significant increase in catalase activity was observed. In the 8th week, the level of activity decreased to a lower

TABLE I. TBARs CONCENTRATION VALUE ([M/mg] OF PROTEINS) IN HEART HOMOGENATES DURING INTOXICATION WITH ETHANOL

Ethanol	Control group	4 th week	8 th week	12 th week
Mean	1.49	1.68	4.52	2.36
SD	0.72	0.85	1.34	0.92
N	10	10	10	10
Statistical analysis				
Control group		Nd	$p < 0.01$	Nd
4 th week	Nd		$p < 0.01$	Nd
8 th week	$p < 0.01$	$p < 0.01$		$p < 0.05$
12 th week	Nd	Nd	$p < 0.05$	

Nd – not detected.

TABLE II. TBARs CONCENTRATION VALUE [M/g Hb] IN ERYTHROCYTES OF RATS CHRONICALLY INTOXICATED WITH ETHANOL

Ethanol	Control	4 th week	8 th week	12 th week
Mean	0.14	0.2	0.24	0.24
SD	0.01	0.04	0.05	0.05
N	10	10	10	10
Statistical analysis				
Control group		$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$
4 th week	$p < 0.01$		nd	$p < 0.05$
8 th week	$p < 0.001$	Nd		Nd
12 th week	$p < 0.001$	$p < 0.05$	Nd	

Nd – not detected.

In the 4th week of ethanol intoxication, a statistically significant increase in hydroperoxide concentration in cardiac muscle homogenate (compared to the

value than in the control group. In the 12th week, the activity of catalase increased compared to the 8th week,

TABLE III. HYDROGEN PEROXIDE CONCENTRATION VALUE ([M/mg] OF PROTEINS) IN HEART HOMOGENATES DURING INTOXICATION WITH ETHANOL

Ethanol	Control	4 th week	8 th week	12 th week
Mean	481.00	2135.94	2119.0	1079.14
SD	123.21	880.56	1425.52	468.12
N	10	10	10	10
Statistical analysis				
Control group		$p < 0.05$	Nd	Nd
4 th week			Nd	Nd
8 th week		Nd		Nd

Nd – not detected.

TABLE IV. SH-GROUP CONCENTRATION VALUE ([M/mg] OF PROTEINS) IN HEART HOMOGENATES IN CHRONIC INTOXICATION WITH ETHANOL

Ethanol	Control	4 th week	8 th week	12 th week
Mean	534.28	320.40	450.20	495.40
SD	197.82	140.45	235.25	120.50
N	10	10	10	10
Statistical analysis				
Control group		$p < 0.01$	Nd	Nd
4 th week			Nd	Nd
8 th week		Nd		Nd

Nd – not detected.

but the level was still lower than the control value (Table V).

Superoxide dismutase [U/gHb] activity was reduced in the 8th and 12th week of the experiment (Table VI).

5. Discussion

The present experiments demonstrated changes in concentration of TBARs, hydrogen peroxide, free SH-groups and changes in defensive antioxidative enzymes activity – catalase and superoxide dismutase in chronic ethanol intoxication.

Ethanol is known for its toxic action. Nowadays, it is thought that oxidative stress is one of the factors which plays an important role in ethanol-induced toxicity [6]. Administration of ethanol to laboratory animals induces an increase in lipid peroxidation in the liver and brain and a reduction in glutathione concen-

tration in the liver [14]. In the blood of alcoholics, a higher level of conjugated dienes – the first products of lipid peroxidation – was observed [10].

In the present experiment, during intoxication, an increase in lipid peroxidation products in erythrocytes and changes in activity of antioxidative enzymes were observed. However, other researchers observed a smaller increase in TBARs level in rat liver homogenates after 6 weeks of 36% ethyl alcohol intake. Moreover, they observed a significant increase in the level of whole and reduced glutathione, and activity of catalase, glutathione reductase and transferase in the liver. The activity of glutathione peroxidase was lower than in the control group [18]. In the present experiments, a reduction in the concentration of free SH-groups in the 4th week of the experiment was observed.

In our own experiments, TBARs concentrations in red blood cells and in cardiac muscle homogenates increased during chronic intoxication.

TABLE V. CATALASE ACTIVITY [U/gHB] IN ERYTHROCYTES OF RATS INTOXICATED WITH ETHANOL

Ethanol	Control	4 th week	8 th week	12 th week
Mean	9.04	11.4	4	7.4
SD	0.87	1.8	0.7	1.4
N	10	10	10	10
Statistical analysis		4 th week	8 th week	12 th week
Control		$p < 0.05$	$p < 0.001$	$p < 0.01$
4 th week			$p < 0.001$	$p < 0.001$
8 th week		$p < 0.001$		$p < 0.001$
12 th week		$p < 0.001$	$p < 0.001$	

TABLE VI. SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY [U/gHb] IN ERYTHROCYTES OF RATS INTOXICATED WITH ETHANOL

Ethanol	Control	4 th week	8 th week	12 th week
Mean	2208	2078	1796	1676
SD	65	189	255	195
N	10	10	10	10
Statistical analysis				
Control		Nd	$p < 0.001$	$p < 0.001$
4 th week			$p < 0.05$	$p < 0.001$
8 th week		$p < 0.05$		Nd
12 th week		$p < 0.001$	Nd	

Nd – not detected.

The observed reduction of TBARs in cardiac homogenates in the 12th week of our study, compared with the 8th week could be explained by the fact that TBARs, especially MDA (malondialdehyde), can in certain conditions react with hydroperoxide, which leads to decomposition of both compounds [13]. In rat erythrocytes, the concentration of TBARs grew with increased duration of intoxication.

Calabrese et al. during the 12th week of ethanol intoxication of rats (2g/kg/day) observed an increase in lipid peroxidation products in liver and brain homogenates [4]. It is worth mentioning, however, that there have also been reports in the literature which indicate no change in malondialdehyde concentration after ethanol consumption [24].

The ability to generate free radicals by ethanol was proven using spin traps and electron paramagnetic resonance [5].

In physiological conditions, there is a balance between production of reactive oxygen species and elimination by intra- and extra-cellular antioxidative systems. Dominance of prooxidative systems over antioxidative ones will lead to oxidative stress. This state can damage cells and causes many diseases, including alcohol cardiomyopathy [8, 11, 12, 20, 25].

Cardiac muscle, like other tissues, has free radical neutralizing enzymes. The most important are: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and non-enzymatic antioxidants.

Ethanol also has an influence on the activity of antioxidative enzymes. In our study, an increase in

catalase activity in the 4th week in red blood cells was observed, but it was reduced at successive time intervals. In the case of superoxide dismutase, the reduction in activity occurred in the 8th and 12th week.

Chronic intoxication with alcohols results in reduction of catalase and dismutase activity [9], which could suggest a decline in the antioxidative defence system. The increase in catalase activity observed in the 4th week of ethanol intoxication could be connected with rapid antioxidative defence. The reduction of activity could be caused by increased production of superoxidative amino-radicals and an excessive amount of hydrogen peroxide during chronic intoxication.

In chronic ethanol intoxication, reduced activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in cardiac muscle homogenates was demonstrated [1].

Sozmen et al. observed a significant increase in catalase activity 1 hour after ethanol administration to rats [24]. D'Almeida et al. [7] stated that after 13 weeks of ethanol intake at a dose of 1.5g/kg, the activity of catalase was reduced. But the activity of this enzyme returned to the initial state two months after withdrawal from ethanol.

6. Conclusions

1. Chronic ethanol intoxication increases the concentration of lipid peroxidation products and hydrogen peroxide in both cardiac homogenates and red blood cells in rats, which suggests development of oxidative stress.
2. Ethanol intoxication over a long period results in reduction of catalase and superoxide dismutase activity and concentration of free SH-groups, which could indicate impairment of antioxidative defence.

References

1. Antonenkov V., Panchenko L., Effect of chronic ethanol treatment under partial catalase inhibition on the activity of enzymes related to peroxide metabolism in rat liver and heart, *The International Journal of Biochemistry* 1998, 20, 823–828.
2. Bartosz G., *Druga twarz tlenu*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1995.
3. Beers R., Sizer T., Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *The Journal of Biological Chemistry* 1952, 195, 133–140.
4. Calabrese V., Renis M., Calderone A. [et al.], Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat, *Free Radical Biology and Medicine* 1998, 24, 1159–1167.
5. Castellanos M., Reyman D., Sieiro C. [et al.], ESR-spin trapping study on the sonochemistry of liquids in the presence of oxygen. Evidence for the superoxide radical anion formation, *Ultrasonics Sonochemistry* 2001, 8, 17–22.
6. Cederbaum A., Introduction-serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury, *Free Radical Biology and Medicine* 2001, 31, 1524–1526.
7. D'Almeida V., Monteiro M. G., Oliveira M. G. [et al.], Long-lasting effects of chronic ethanol administration on the activity of oxidant enzymes, *The Journal of Biochemical Toxicology* 1994, 9, 141–143.
8. Edes I., Piros G., Forster T. [et al.], Alcohol-induced congestive cardiomyopathy in adult turkeys effects on myocardial antioxidant defence systems, *Basic Research in Cardiology* 1995, 82, 551–556.
9. Gałeczki P., Jurczyk A., Kędziora J. [i in.], Wpływ etanolu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i peroksydację lipidów w erytrocytach, *Przegląd Wojskowo-Medyczny* 2001, 43, 353–360.
10. Guttierrez-Salinas J., Zentelaa de Pina M., Pina E., Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes, *Biochemistry and Molecular Biology International* 1993, 29, 263–270.
11. Harkany T., Sasvari M., Nyakas C., Chronic ethanol ingestion-induced changes in open-field behavior and oxidative stress in the rat, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1997, 58, 195–201.
12. Jakovcenko V., Grudcyn G., Heart diseases in alcoholics, *Bratislavské Lekárske Listy* 1990, 91, 100–105.
13. Janero D. R., Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, *Free Radical Biology and Medicine* 1990, 9, 515–540.
14. Kurose I., Higuchi H., Kato S., Ethanol-induced oxidative stress in the liver, Alcoholism, *Clinical and Experimental Research* 1996, 20, 77–85.
15. Liczmański A. E., Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy obronne, *Postępy Biochemii* 1988, 34, 293–310.
16. Misra H. P., Fridovich J., The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay of superoxide dismutase, *Journal of Biological Chemistry* 1972, 247, 3170–3173.
17. Niemelä O., Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo, *Free Radical Biology and Medicine* 2001, 31, 1533–1538.
18. Oh S. I., Kim C. I., Chun K. J. [et al.], Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver, *Journal of Nutrition* 1998, 128, 758–763.
19. Placer Z., Cushman L., Johnson B., Estimation of product of lipid peroxidation malondialdehyde in biochemical systems, *Annals of Clinical Biochemistry* 1966, 16, 359–364.
20. Ribiere C., Hininger I., Rouach H. [et al.], Effects of chronic ethanol administration on free radical defense in

- rat myocardium, *Biochemical Pharmacology* 1992, 44, 1495–1500.
21. Ruch W., Cooper P. H., Baggiolini M., Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horseradish peroxidase, *Journal of Immunological Methods* 1983, 63, 347–357.
 22. Santiard D., Ribiere C., Nordmann R., Houee-Levin C., Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study, *Free Radical Biology and Medicine* 1995, 19, 121–127.
 23. Soffia F., Penna M., Ethanol metabolism by rat heart homogenates, *Alcohol and Alcoholism* 1987, 4, 45–48.
 24. Sozmen E. Y., Tanyalcin T., Onat T. [et al.], Ethanol induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes, *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1994, 32, 741–744.
 25. Tsyplenkova V., Sholts D., A critical analysis of experimental models of alcoholic cardiomyopathy, *Arkhiv Patologii* 1989, 50, 79–84.
 26. Yagi K., Lipid peroxides and human diseases, *Chemistry and Physics of Lipids* 1987, 45, 337–351.

Corresponding author

Ewa Meissner
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytetu Medycznego
ul. Sędziowska 18 a
91-304 Łódź
e-mail: e.meissner@wp.pl

ANALIZA WYBRANYCH PARAMETRÓW STRESU OKSYDACYJNEGO I UKŁADU ANTYOKSYDACYJNEGO W HOMOGENATACH SERCA I WE KRWI W PRZEWLEKŁEJ, DOŚWIADCZALNEJ INTOKSYKACJI ALKOHOLEM ETYLOWYM

1. Wstęp

Alkohol etylowy należy do powszechnie spożywanym składników napojów alkoholowych. Jest trucizną działającą głównie depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy oraz silną trucizną metaboliczną. Jego dłuższe spożywanie doprowadza do uszkodzenia wątroby, układu sercowo-naczyniowego, układu pokarmowego oraz uszkodzenia w obrębie układu oddechowego. W toku przemian etanolu powstaje między innymi aldehyd octowy, wolne rodniki, nadtlenek wodoru, produkty peroksydacji lipidów, które generują uszkodzenia DNA.

Etanol jest jednym z czynników indukujących wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT). Rola etanolu w odniesieniu do RFT nie jest jednoznaczna. Alkohol etylowy, w aspekcie stresu tlenowego, może wykazywać działanie dwukierunkowe – z jednej strony może prowadzić do generacji reaktywnych form tlenu, zaś z drugiej może wykazywać działanie antyoksydacyjne, będąc tzw. zmiataczem rodnika wodorotlenowego [2, 6].

Przewlekłe nadużywanie alkoholu etylowego prowadzi do uszkodzenia zarówno mięśnia sercowego, jak i mięśni szkieletowych [8, 17, 23].

Reaktywne formy tlenu (RFT) to pochodne tlenowe, które, posiadając jeden lub więcej niesparowanych elektronów na zewnętrznym orbitalu, są zwane wolnymi rodnikami, np. rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^\cdot), rodnik wodorotlenowy (OH^\cdot), anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$), jak i te, które nie posiadają takich elektronów np. nadtlenek wodoru (H_2O_2) [2].

Efektom działania RFT na komórki i ich składniki może być m.in. peroksydacja lipidów błon, utlenianie związków drobnocząsteczkowych (glutation, askorbinian), pęknięcia nici DNA, uszkodzenie zasad DNA, uszkodzenia chromosomów, inhibicja fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, powstawanie mutacji i transformacja nowotworowa komórek.

Peroksydacja lipidów jest najbardziej znanym biologicznym procesem wolnorodnikowym, w którym są utleniane nienasycone kwasy tłuszczowe lub inne lipidy, a także powstają nadtlarki tych związków. Produktami tego procesu są TBARs (substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym), do których należy między innymi aldehyd malonowy (MDA).

W organizmach tlenowców występują mechanizmy ochronne przeciwdziałające toksycznemu działaniu tlenu. Mechanizmy te są związane z obecnością w cytozolu,

w organellach, w błonie komórkowej oraz w płynach ustrojowych rozmaitych substancji o różnym mechanizmie działania. W cytozolu i mitochondriach występują substancje o charakterze enzymatycznym i nieenzymatycznym, które zapobiegają toksycznym wpływom wolnych rodników tlenowych [15, 22]. Najbardziej znane z nich to: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza oraz peroksydaza. Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje reakcję przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego. Katalazy rozkładają nadtlenek wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego, zaś peroksydazy są enzymami, które usuwają również nadtlenek wodoru.

2. Cel pracy

Celem niniejszych badań była ocena nasilenia peroksydacji lipidów w homogenatach serca i w krwinkach czerwonych poprzez pomiar stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARs), ocena wielkości generacji nadtlenu wodoru z homogenatów serca, ocena stopnia odpowiedzi układu antyoksydacyjnego w sercu i krwi intoksykowanych zwierząt poprzez pomiar stężenia wolnych grup $-\text{SH}$ w homogenatach oraz aktywności enzymów katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach.

3. Materiał i metody

Eksperyment przeprowadzono na szczurach szczepu wsobnego Lewis, samcach o masie ok. 240–290 g w wieku ok. 6 miesięcy. Do badań użyto 30 szczurów, które podzielono na trzy równoliczebne podgrupy, którym podawano do picia 1 M roztwór alkoholu etylowego, a szczury uśmiercano w 4, 8, i 12 tygodniu doświadczenia przez otwarcie klatki piersiowej po wcześniejszym uśpieniu Vetbutalem (pentobarbital) w dawce 30 mg/kg m.c. podanym dootrzewnowo. Grupę kontrolną stanowiło 10 szczurów, którym do picia podawano wodę. Zwierzęta przebywały w czasie doświadczenia w klatkach po 5 osobników, w temperaturze 20 °C ze swobodnym dostępem do pokarmu (pasza granulowana Murigran). Krew do badań pobierano podczas sekcji zwierząt z serca do probówki z antykoagulantem EDTA. Masę erytrocytarną przemywano trzykrotnie oziębionym do temperatury 4 °C 0,9%

roztworem NaCl w stosunku objętościowym 1:2 i zamrażano w temperaturze -20 C do dalszych badań. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (CuZn-SOD) oznaczano metodą Misry i Fridovicha [16] oraz katalazy (CAT) metodą Beersa i Sizera [3]. Stężenie TBARs w erytrocytach oznaczano metodą Placera i in. [19].

Serce po pobraniu wycinków do mikroskopii świetlnej i elektronowej przechowywano w temperaturze -80 C do czasu wykonania homogenatów. Stężenie produktów TBA-reaktywnych oznaczano metodą spektrofotometryczną [26], pomiar wielkości generowania nadtlenu wodoru z homogenatów narządowych metodą spektrofotometryczną z kwasem homowanilinowym i peroksydazą chrzanową [21], zaś stężenie rozpuszczalnych grup $-SH$ metodą z odczynnikiem Ellmana.

Wszystkie opisane procedury uzyskały pozytywną akceptację Lokalnej Komisji Etycznej w Łodzi do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach decyzją nr Ł/BD/53 z dnia 22.05.2001 r.

Analizę statystyczną wyników opracowano w oparciu o testy parametryczne (t-Studenta dla małych prób przy poziomie istotności $p < 0,05$) po wcześniejszym przeprowadzeniu testów normalności rozkładu zmiennych – test Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Do wielokrotnych porównań zastosowano analizę wariancji Anova. W celu wybrania odpowiedniego testu sprawdzono, czy odpowiednie próby podlegały rozkładowi normalnemu (test Shapiro-Wilka). W przypadku rozkładu nienormalnego stosowano test nieparametryczny U Manna-Whitneya. Obliczenia przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Statistica.

4. Wyniki

W 8 tygodniu intoksykacji alkoholem etylowym obserwowano w homogenatach mięśnia sercowego niemal 3-krotny wzrost TBARs w stosunku do grupy kontrolnej oraz znamieny statystycznie wzrost w stosunku do grupy 4-tygodniowej. W 12 tygodniu doświadczenia nastąpił niemal dwukrotny spadek stężenia TBARs w porównaniu do stężenia w 8 tygodniu (zob. tabela I).

Przeprowadzone badania biochemiczne wykazały w krwinkach czerwonych szczurów przewlekle intoksykowanych alkoholem etylowym wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów w przeliczeniu na gram hemoglobiny w każdym badanym przedziale czasowym (w 4, 8 i 12 tygodniu) w stosunku do grupy odniesienia (zob. tabela II).

W 4 tygodniu intoksykacji roztworem etanolu obserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia nadtlenu wodoru w homogenacie mięśnia sercowego w porównaniu do grupy kontrolnej. W pozostałych grupach różnice nie były istotne statystycznie (zob. tabela III).

W 4 tygodniu doświadczenia obserwowano spadek stężenia wolnych grup tiolowych w porównaniu z grupą odniesienia. Nie obserwowano natomiast takich różnic między pozostałymi grupami a grupą odniesienia w 8 i 12 tygodniu intoksykacji (zob. tabela IV).

W 4 tygodniu doświadczenia podczas intoksykacji szczurów I M alkoholem etylowym zaobserwowano znamieny statystycznie wzrost aktywności katalazy. W 8 tygodniu doświadczenia aktywność ta spadła do wartości niższej niż w grupie kontrolnej. W 12 tygodniu intoksykacji aktywność katalazy wzrosła w porównaniu z 8 tygodniem, jednak do wartości niższej niż w grupie porównawczej (zob. tabela V).

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej zmalała w 8 i 12 tygodniu doświadczenia (zob. tabela VI).

5. Dyskusja wyników

Przeprowadzone doświadczenia na szczurach wykazały zmiany w zakresie stężeń TBARs, nadtlenu wodoru, wolnych grup SH oraz zmianę aktywności enzymów obrony antyoksydacyjnej – katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej w przewlekłej intoksykacji etanolem.

Toksyczność etanolu jest dobrze znana. Obecnie sądzi się, że stres oksydacyjny jest jednym z czynników decydujących o tej toksyczności [6]. Podawanie zwierzętom doświadczalnym etanolu powoduje wzmożenie peroksydacji lipidów w wątrobie i w mózgu oraz obniżenie stężenia glutationu w wątrobie [14]. We krwi nałogowych alkoholików stwierdzono podwyższony poziom sprzężonych dienów – początkowych produktów peroksydacji lipidów [10].

W doświadczeniu przeprowadzonym przez autorów niniejszej pracy zaobserwowano w miarę trwania intoksykacji wzrost produktów peroksydacji lipidów w erytrocytach oraz zmianę aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Inni badacze zaobserwowali nieznaczny wzrost poziomu TBARs w homogenatach wątroby szczurów, którym podawano przez 6 tygodni 36% alkohol etylowy. Zaobserwowano natomiast w wątrobie znaczny wzrost całkowitego i zredukowanego glutationu, a ponadto aktywności katalazy, reduktazy glutationowej i transferazy glutationowej. Aktywność peroksydazy glutationowej była niższa niż w grupie kontrolnej [18]. W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano spadek stężenia wolnych grup SH w 4 tygodniu doświadczenia.

Wykonane badania własne wykazały wzrost stężenia TBARs zarówno w krwinkach czerwonych, jak i w homogenatach serc szczurów, w przewlekłej intoksykacji etanolem.

Obserwowany w opisanych tu badaniach znaczny spadek TBARs w homogenatach serc w 12 tygodniu doświadczenia w stosunku do wartości z 8 tygodnia można wytłumaczyć w ten sposób, że TBARs, a zwłaszcza

MDA (dialdehyd malonowy), może w pewnych warunkach reagować z nadtlaniem wodoru, co prowadzi do rozkładu obu związków [13]. W erytrocytach szczurów stężenie TBARs w miarę trwania intoksykacji rosło.

Calabrese i in. zaobserwowali w czasie 12-tygodniowej intoksykacji szczurów etanolem w dawce 2g/kg/dzień wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów w homogenatach wątroby i mózgu [4]. Jednakże warto zaznaczyć, że istnieją w piśmiennictwie także doniesienia wskazujące, że stężenie dialdehydu malonowego po spożyciu etanolu nie zmieniało się [24].

Zdolność etanolu do generowania wolnych rodników została dowiedziona w sposób bezpośredni z zastosowaniem pułapek spinowych i metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego [5].

W warunkach fizjologicznych istnieje zwykle stan równowagi między wytwarzaniem reaktywnych form tlenu a ich eliminacją przez wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe liczne układy antyoksydacyjne. Przewaga układów prooksydacyjnych nad antyoksydacyjnymi doprowadza do rozwoju stresu oksydacyjnego. Stan ten może powodować uszkodzenie komórek, doprowadzając do rozwoju wielu chorób, w tym również kardiomiopatii alkoholowej [8, 11, 12, 20, 25].

Mięsień serca, jak inne tkanki, posiada enzymy neutralizujące wolne rodniki. Najważniejsze z nich to: dysmutaza nadadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa oraz antyoksydanty nieenzymatyczne.

Etanol wywiera również wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. W opisanym tu doświadczeniu zaobserwowano wzrost aktywności katalazy w krwinkach czerwonych w 4 tygodniu intoksykacji, zaś w kolejnych przedziałach czasowych obserwowano spadek aktywności tego enzymu. W przypadku dysmutazy nadadtlenkowej stwierdzono spadek aktywności w 8 i 12 tygodniu.

Długotrwała intoksykacja alkoholami powoduje spadek aktywności katalazy i dysmutazy [9], co może świadczyć o wyczerpaniu obrony antyoksydacyjnej. Obserwowany w 4 tygodniu intoksykacji etanolem wzrost aktywności katalazy może być związany z gwałtowną obroną antyoksydacyjną organizmu. Obniżenie aktywności może być spowodowane zwiększoną produkcją anionorodników nadadtlenkowych oraz nadmiarem nadtlenu wodoru w przebiegu przewlekłej intoksykacji.

W intoksykacji przewlekłej etanolem opisano spadek aktywności katalazy, dysmutazy nadadtlenkowej i peroksydazy glutationowej w homogenatach mięśnia sercowego [1]. Sozmen i in. zaobserwowali znaczny wzrost aktywności katalazy po 1 godzinie od podania szczurom etanolu [24]. D'Almeida i inni [7] stwierdzili spadek aktywności katalazy po 13 tygodniach przyjmowania etanolu w dawce 1,5 g/kg masy ciała i powrót aktywności tego enzymu do stanu wyjściowego po dwóch miesiącach od zaprzestania intoksykacji.

6. Wnioski

1. Przewlekła intoksykacja etanolem powoduje wzrost stężeń produktów peroksydacji lipidów i nadtlenu wodoru zarówno w homogenatach serc szczurów, jak i w krwinkach czerwonych, co sugeruje rozwój stresu oksydacyjnego.
2. Długotrwałe podawanie etanolu powoduje spadek aktywności enzymów – katalazy i dysmutazy nadadtlenkowej oraz stężenia wolnych grup tiolowych, co przemawia za upośledzeniem obrony antyoksydacyjnej.