



Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum



**Wydział Farmaceutyczny
i Oddział Analityki Medycznej**

Jolanta Szabla

**Hemolityczne działanie
eterów alkilowych glikolu etylenowego
– rola ATPaz**

**Praca doktorska wykonana w Zakładzie
Biochemii Toksykologicznej**

Promotor: prof. dr hab. Andrzej Starek

Kraków 2007

*Niniejszym składam gorące podziękowania
promotorowi, **Panu prof. dr hab. Andrzejowi Starkowi**,
za nieocenioną pomoc,
poświęcony czas i cenne wskazówki,
bez którego nie powstałaby ta praca
oraz **Pani prof. dr hab. Katarzyny Kieć – Kononowicz**
za syntezę kwasów alkoksyoctowych.*

*Dziękuję również całemu Zespołowi
z Zakładu Biochemii Toksykologicznej CMUJ
za pomoc w pracy doświadczalnej.*

Mężowi i Rodzicom
za cierpliwość i wyrozumiałość.

Spis treści

1. Wstęp	1
2. Założenia i cel pracy.....	22
3. Materiały i metody.....	24
3.1 Odczynniki.....	24
3.1.2 Synteza kwasów alkoksyoctowych (PEAA, BAA, PAA)...	25
3.2 Zwierzęta laboratoryjne	26
3.3 Przebieg doświadczenia <i>in vivo</i>	29
3.3.1 Badania hematologiczne	27
3.4 Ocena wpływu etanolu, pirazolu i metylopirazolu na przebieg ostrej hemolizy indukowanej przez BE.....	28
3.5 Przebieg doświadczenia <i>in vitro</i>	29
3.5.1 Izolacja erytrocytów szczurzych i ludzkich.....	29
3.5.2 Ocena hemolitycznego działania kwasów alkoksyoctowych na erytrocyty szczurze i ludzkie	29
3.6 Izolacja błon erytrocytów szczurzych i ludzkich do oznaczania ATPaz	31
3.7 Oznaczanie aktywności Na ⁺ /K ⁺ -ATPazy komercyjnej oraz ATPaz w cieniach erytrocytów szczurzych i ludzkich (Na ⁺ /K ⁺ /Mg ²⁺ -ATPazy, Na ⁺ /K ⁺ -ATPazy, Ca ²⁺ -ATPazy)	32
3.7.1 Oznaczanie fosforu nieorganicznego	32
3.7.2 Wpływ odczynników odbiałczających na rozpad ATP.....	34
3.7.3 Zależność aktywności enzymu od stężenia substratu	36
3.7.4 Zależność aktywności enzymu od czasu inkubacji	38
3.7.5 Wpływ stężenia białka cieni erytrocytarnych na aktywność ATPaz	39

3.7.6 Wpływ kwasów alkoksyoctowych na Na ⁺ /K ⁺ -ATPazę komercyjną oraz ATPazy w cieniach erytrocytów szczurzych i ludzkich (Na ⁺ /K ⁺ /Mg ²⁺ -ATPazę, Na ⁺ /K ⁺ -ATPazę oraz Ca ²⁺ -ATPazę)	40
4. Analiza statystyczna	42
5. Wyniki	43
5.1 Hemolityczne działanie EGAE u szczurów <i>in vivo</i>	43
5.2 Etanol, metylopirazol i pirazol jako swoiste odtrutki w ostrym zatruciu EGAE.....	56
5.3 Hemolityczne działanie kwasów alkoksylowych na eryocyty szczura i człowieka <i>in vitro</i>	62
5.4 Wpływ AAA na aktywność komercyjnej Na ⁺ /K ⁺ -ATPazy	74
5.5 Wpływ AAA na aktywność ATPaz w cieniach erytrocytów szczura i człowieka.....	77
6. Dyskusja	92
6.1 Hemolityczne działanie EGAE <i>in vivo</i> oraz AAA <i>in vitro</i>	92
6.2 Mechanizmy hemolitycznego działania EGAE	102
7. Wnioski	111
8. Streszczenie	112
9. Summary	114
10. Piśmiennictwo	116

Wykaz skrótów stosowanych w pracy:

- AAA – kwasy alkoksyoctowe
- ADH – dehydrogenaza alkoholowa
- ALDH – dehydrogenaza aldehydowa
- ATP – adenozynotrifosforan
- BAA – kwas 2-butoksyoctowy
- BE – 2-butoksyetanol
- CI – przedział ufności
- EAA – kwas 2-etoksyoctowy
- EC₅₀ – efektywne stężenie wywołujące zmiany o 50%
- EC₂₅ – efektywne stężenie wywołujące zmiany o 25%
- EE – 2-etoksyetanol
- ED₅₀ – efektywna dawka wywołująca zmiany o 50%
- EGAE – etery alkilowe glikolu etylenowego
- HGB – hemoglobina całkowita
- HGB_o – hemoglobina osoczowa
- Ht – hematokryt
- IPE – 2-izopropoksyetanol
- IC₅₀ – stężenie inhibitora wywołujące zmiany o 50%
- K_i – stała hamowania (inhibicji)
- MAA – kwas 2-metoksyoctowy
- MALD – aldehyd metoksyoctowy
- MCH – średnia masa hemoglobiny w krwince
- MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w 100 ml krwinek
- MCV – średnia objętość krwinki
- ME – 2-metoksyetanol
- MP – 4-metylopirazol
- OUN – ośrodkowy układ nerwowy
- PAA – kwas 2-propoksyoctowy

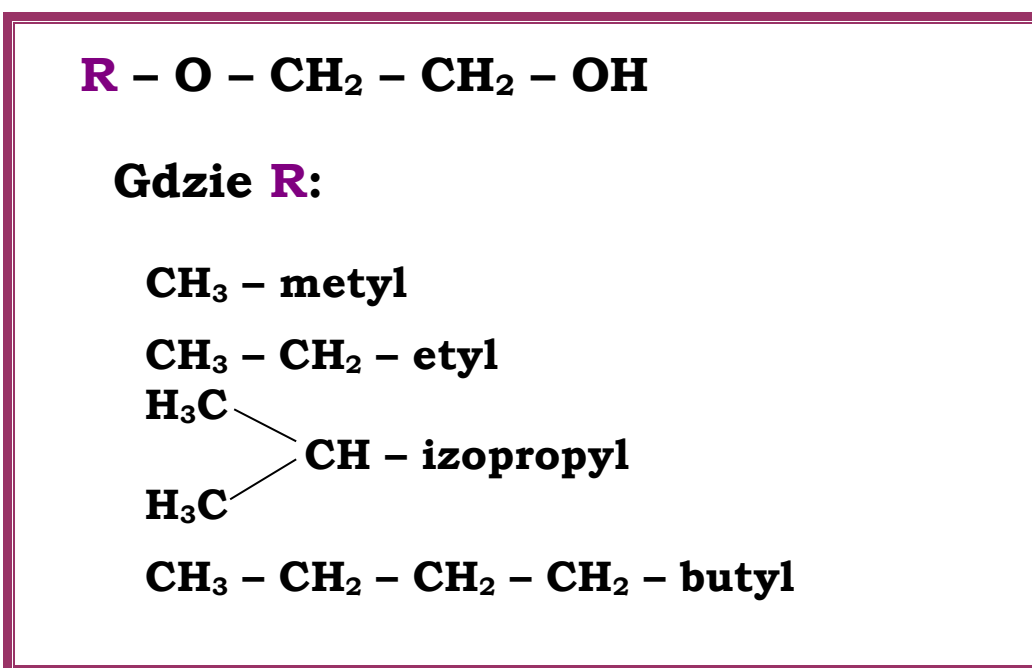
- PCA – kwas nadchlorowy
- PEAA – kwas 2-pentoksyoctowy
- PhE – 2-fenoksyetanol
- PY – pirazol
- RBC – liczba erytrocytów
- Ret – liczba retikulocytów
- ROS – reaktywne formy tlenu
- TCA – kwas trichlorooctowy

1. WSTĘP

1.1 Właściwości fizykochemiczne i zastosowanie eterów alkilowych glikolu etylenowego.

Etery alkilowe glikolu etylenowego (EGAE) są bezbarwnymi cieczami o charakterystycznym łagodnym zapachu aromatycznym. EGAE otrzymywane są w reakcji tlenku etylenu z odpowiednimi alkoholami oraz poprzez bezpośrednią alkilację glikolu etylenowego (Morrison, 1986).

EGAE łączą cechy alkoholi i eterów tj. hydrofilowość i lipofilowość. O ile 2-metoksyetanol (ME) i 2-etoksyetanol (EE) są związkami hydrofilowymi, to 2-izopropoksyetanol (IPE) i 2-butoksyetanol (BE) wykazują przewagę właściwości lipofilowych. Ogólny wzór tych związków przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Ogólny wzór eterów alkilowych glikolu etylenowego.

EGAE są związkami, których masy cząsteczkowe, gęstości, temperatury wrzenia oraz współczynniki podziału n-oktanol/woda rosną wraz z liczbą atomów węgla w cząsteczce, podczas gdy prężności par maleją (Morrison, 1986; Patty, 1994).

Właściwości fizykochemiczne wyżej wymienionych EGAE przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne eterów alkilowych glikolu etylenowego.

Eter	Nr wg CAS	Masa cząsteczkowa	gęstość (g/cm ³)	temp. wrzenia (°C)	prężność par (hPa)	Log P
ME	109-86-4	76,1	0,962	124,2	9,7	-0,77
EE	110-80-5	90,1	0,926	135,0	5,75	-0,18
IPE	2807-30-9	104,15	0,909	150 - 152	2,9	0,23
BE	111-76-2	118,17	0,898	170,8	0,88	0,72

EGAE są szeroko stosowane w przemyśle jako rozpuszczalniki farb, lakierów, pestycydów, żywic naturalnych i syntetycznych, jako komponenty preparatów do czyszczenia na sucho szkła, przedmiotów metalowych i skóry syntetycznej, środki poślizgowe dodawane do wyrobów tekstylnych oraz składniki insektycydów i herbicydów. Związki te służą także do produkcji pigmentów, atramentów, tuszów, kosmetyków samochodowych i płynów hydraulicznych (Smith, 1984; ACC, 2000; The Merck, 2001).

Na początku lat 80-tych ubiegłego stulecia stwierdzono, że ME i EE są substancjami szkodliwymi dla zdrowia człowieka, co spowodowało

zmianę profilu ich produkcji i stosowania. Wynikiem tego był spadek rocznego zużycia ME ze 140 tys. ton w latach 70-tych do 40 tys. ton w roku 2000 oraz EE z 90 tys. ton w latach 70-tych do 12 tys. ton w roku 2000. Obecnie ME i EE nie są stosowane w preparatach chemii gospodarczej, natomiast nadal są stosowane w przemyśle, gdzie narażenie podlega kontroli.

Z drugiej strony nastąpił wzrost zużycia BE ze 145 tys. ton w latach 70-tych do 175 tys. ton w roku 2002 (Kettenis, 2005; Boatman, 2005). Wielkość produkcji samego BE w Unii Europejskiej przekracza 1000 ton rocznie (SCOEL, 2005). W Polsce ponad 1000 pracowników zatrudnionych w 5 zakładach przemysłu farb i lakierów narażonych jest na BE w zakresie niskich stężeń, tj. 0 – 6,9 mg/m³ (Wesołowski i Gromiec, 1997).

Obok narażenia zawodowego na EGAE występuje również narażenie pozazawodowe związane z ich szerokim stosowaniem w gospodarstwie domowym (Morrison, 1986; Patty, 1994; Smith, 1984). Obecnie, jak podaje Consumer Products Safety Commission, z pośród 740 produktów przeznaczonych do użytku domowego ponad połowa zawiera BE (USCPSC, 2005).

EGAE, a zwłaszcza BE, stosowane są jako substytuty glikolu etylenowego, otrzymane przez modyfikację jego cząsteczki. Modyfikacja ta polega na zablokowaniu jednej z grup hydroksylowych za pomocą grupy alkilowej lub arylowej, natomiast pozostawienie drugiego hydroksylu w postaci wolnej lub zestryfikowanej kwasem octowym. Modyfikacje te wyraźnie osłabiają toksyczność glikolu etylenowego przez utrudnienie tworzenia się kwasu szczawiowego, jako głównego metabolitu odpowiedzialnego za kwasicę metaboliczną i inne zmiany patologiczne w organizmie.

Powszechna dostępność EGAE stwarza ryzyko narażenia ludzi na ich działanie. W kazuistyce ostrych zatruc coraz częściej odnotowuje się zatrucia spowodowane przypadkowym lub celowym wypiciem płynów zawierających EGAE. W dużej mierze dotyczą one osób dorosłych oraz dzieci między 5 a 6 rokiem życia. Objawy zatrucia 19 – letniego mężczyzny, który wypił ok. 360 ml środka do czyszczenia okien zawierającego 22% BE, przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Objawy zatrucia ostrego występujące po spożyciu BE (Vincent i wsp., 1993).

Układ i narząd krytyczny	Obserwowane objawy zatrucia
ośrodkowy układ nerwowy	objawy encefalopatii, senność
układ oddechowy	hipowentylacja
układ krążenia	zwolnienie akcji serca, spadek ciśnienia tętniczego
krew obwodowa	Ht < 24%, liczba płytek krwi < $88 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ – po 96 h
wątroba	ALT 134 U/L, AspAT 60 U/L –po 24 h
nerki	hematuria po 24 h, krwinki czerwone >10 w polu widzenia

Zmiany hematologiczne obserwowane u 4 innych pacjentów, którzy celowo wypili preparaty zawierające BE przedstawia tabela 3. Dodatkowo u wszystkich pacjentów wystąpiła śpiączka i kwasica metaboliczna (Rambourg – Schepens i wsp., 1988; Gijsenbergh i wsp., 1989; Litovitz i wsp., 1990; Bauer i wsp., 1992).

Tabela 3. Objawy zatrucia występujące po wypiciu BE.

Płeć	Wiek pacjenta	Stężenie HGB (g/dl)	Inne objawy zatrucia	Piśmiennictwo
K	50	9,7	hemoglobinuria, niewydolność nerek	Rambourg- Schepens i wsp., 1988
K	23	8,9	hematuria	Gijsenbergh i wsp., 1989
K	87	-	zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, niewydolność nerek	Litovitz i wsp., 1991
M	45	9,1	niedokrwistość, trombocytopenia	Bauer i wsp., 1992

K – kobieta; M – mężczyzna

Odnotowano również dwa przypadki ostrego zatrucia po przypadkowym wypiciu ok. 100 ml preparatu zawierającego ME. Objawami klinicznymi zatrucia było: ogólne osłabienie, bóle głowy, upośledzenie koncentracji uwagi i nudności. Objawy te ustąpiły po 8-18 godz. od wypicia preparatu. Badania laboratoryjne wykazały kwasicę metaboliczną, a w moczu wzrost szczawianów. Po upływie 3-4 tygodni leczenia nie stwierdzono żadnych następstw tego zatrucia (Nitter-Hauge, 1970).

Również EE był przyczyną ostrych zatruc u ludzi. Po wypiciu 40 ml środka zawierającego ten eter wystąpiły zawroty głowy i krótka utrata świadomości. Ponadto, stwierdzono ogólne zasinienie głównie twarzy i zapach acetonu w powietrzu wydechowym. Zmiany te cofały się całkowicie po 44 dniach od zatrucia (Bingham i wsp., 2001)

1.2 Metabolizm eterów alkilowych glikolu etylenowego.

Ciekłe EGAE wchłaniane są do organizmu z przewodu pokarmowego i przez nieuszkodzoną skórę, a ich pary w drogach oddechowych, a także przez skórę (Ghanayem i wsp., 1987; Johanson, 1986). Uważa się, że skóra stanowi główną drogę wchłaniania tych eterów. U osób narażonych na pary EGAE, wchłanianie przez skórę oszacowano na poziomie 55% ME, 42% EE oraz 15-27 %BE w stosunku do ich stężeń w powietrzu przyjętych za 100% (Carpenter i wsp., 1956; Corley i wsp., 1997; Kezic i wsp., 1997a). Wyniki te zostały potwierdzone szybkością wchłaniania EGAE przez skórę ludzką w warunkach *in vitro*, która maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego grupy alkoksyłowej. Szybkości te wynosiły 2,82, 0,8 i 0,2 mg/cm²/godz. odpowiednio dla ME, EE i BE (Rowe i wsp., 1994; Kezic i wsp., 1997b.).

Około 25 – 60% wchłoniętej do organizmu dawki EGAE jest utleniane do odpowiednich aldehydów, a następnie do kwasów alkoksyoctowych (AAA) przy udziale kolejno cytozolowej dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) (Ghanayem i wsp., 1987; Wilkin i Stewart, 1987). Za pomocą techniki elektroforetycznej wykryto 3 klasy izoenzymów ADH różniące się swoistością substratową i narządową. ADH-1 występuje przede wszystkim w żołądku, płucach i tkankach oka. ADH-2 wykryto w tych samych narządach co ADH-1 i wątrobie, natomiast ADH-3 stwierdzono głównie w wątrobie (Julia i wsp., 1987). Aasmoe i wsp. (1997) wykazali, że tylko ADH-3 odgrywa istotną rolę w metabolizmie EGAE. ADH-2 metabolizuje jedynie średnio- i długołańcuchowe alkohole.

EE, BE i 2-fenoksyetanol (PhE) są metabolizowane *in vitro* przez preparaty cytozolowe hepatocytów i skóry zawierające zarówno ADH jak i ALDH (Lockley i wsp., 2005). Cytozol hepatocytów metabolizuje

preferencyjnie etanol, a nie długołańcuchowe EGAE. Z drugiej strony preparaty cytozolowe skóry preferencyjnie metabolizują etery glikolowe. Stwierdzono, że za utlenianie EGAE odpowiedzialne są głównie izoformy ADH-3 i ALDH-1 dehydrogenaz. Wielokrotne narażenie na EGAE prowadzi do indukcji tych enzymów. O ile utlenianie alkoholi przy udziale ADH przez cytozol wątroby szczura było najwydajniejsze w przypadku etanolu, a następnie EE i BE, to w przypadku frakcji cytozolowej skóry szczura kolejność była odwrotna ($BE > EE > \text{etanol}$) (Lockley i wsp., 2005).

Chociaż skóra zawiera enzymy zdolne do metabolizowania EGAE, które są zlokalizowane w warstwie podstawnej naskórka (Coomes i wsp., 1983), to fizykochemiczne właściwości tych związków, powodują ich szybkie wchłanianie do głębszych warstw skóry i wyraźny spadek ich metabolizmu w skórze podczas wchłaniania tą drogą (Lockley i wsp., 2002). Tak więc, wątroba jest głównym narządem metabolizującym EGAE.

Ponadto, szybkość utleniania EGAE przez ADH-3 do odpowiednich AAA rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego od ME do BE (Medinsky i wsp., 1990). Szybkość tego procesu wzrasta również wraz ze wzrostem dawki ME i EE. Natomiast w przypadku BE dochodzi do spadku ilości kwasu butoksyoctowego (BAA) wraz ze wzrostem dawki BE w wyniku wysycenia procesu metabolicznego. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach Aasmoe i wsp. (1998) nad kinetyką reakcji metabolicznych EGAE z udziałem ADH. Autorzy ci wykazali, że stała substratowa (K_m) dla BE ($0,27 \pm 0,11$ mM) jest około 10 razy niższa niż dla ME ($3,61 \pm 1,13$ mM) i EE ($2,23 \pm 0,56$ mM), podczas, gdy V_{max} jest prawie takie samo (7 ± 2 mmol NADH/min/mg białka). Dlatego przy identycznych stężeniach EGAE biotransformacja BE do BAA jest znacznie wydajniejsza niż pozostałych eterów. Niskie wartości K_m w

przypadku BE wskazują, iż reakcja z udziałem ADH będzie wysycona przy niższym stężeniu tego związku w porównaniu ze stężeniami ME i EE.

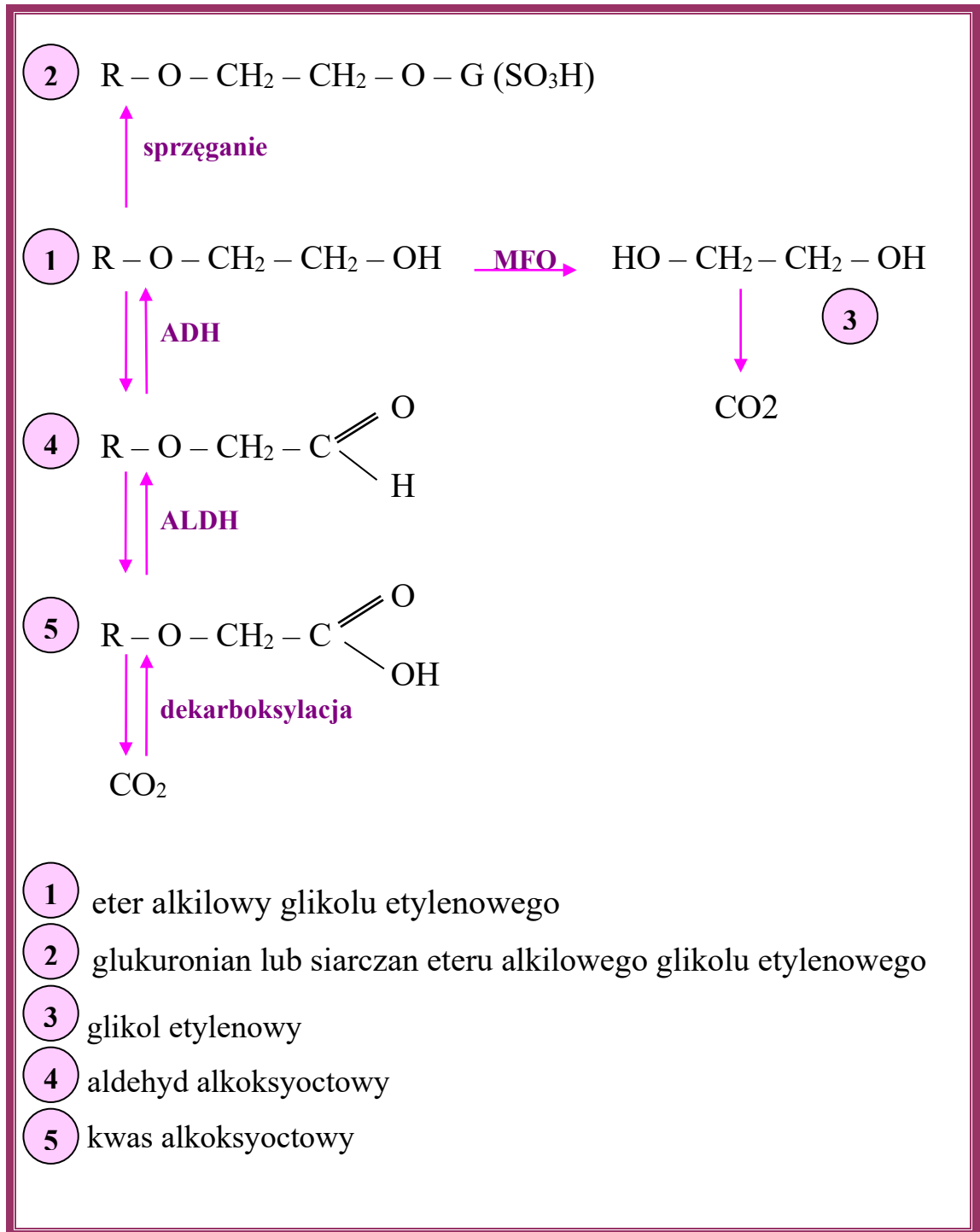
Omawiane procesy metaboliczne EGAE zachodzą głównie w hepatocytach i skórze, komórkach nabłonka górnych dróg oddechowych i nabłonka plemnikotwórczego, a powstające AAA są wydalane przez nerki, na ogół w postaci koniugatów z glutaminą i glicyną (u człowieka 67%) (Morel i wsp., 1996; Corley i wsp., 1997).

Ponadto, po rozszczepieniu wiązania eterowego, kwas octowy ulega katabolizmowi do CO₂ (8 – 10%) (Corley i wsp., 1997).

Alternatywnym torem metabolicznym względem procesu utleniania EGAE jest sprzężanie związków macierzystych z kwasem glikuronowym i siarkowym, a następnie wydalanie ich przez nerki (Ghanayem i wsp., 1987). Jest to główna przemiana tych związków w przypadku zablokowania ADH za pomocą pirazolu, jako inhibitora tego enzymu (Ghanayem i wsp., 1987; Medinsky i wsp., 1990).

Ponadto, przy udziale mikrosomalnej monooksygenazy, zależnej od cytochromu P₄₅₀ (CYP), etery te mogą ulegać O-dealkilacji do glikolu etylenowego (wydajność tego procesu 10% - 21% dawki), który jest utleniany poprzez glioksal, kwas glikolowy i szczawiowy do CO₂. Stąd też w obrazie klinicznym zatrucia EGAE, a zwłaszcza ME i EE, pojawiają się objawy kwasicy metabolicznej (Medinsky i wsp., 1990; Shyr i wsp., 1993).

Ilości powstającego glikolu etylenowego i glukuronidu BE zależą od rodzaju eteru, drogi narażenia i wielkości narażenia. W przypadku ME, EE i BE ilości generowanego glikolu etylenowego wynosiły odpowiednio: 21%, 18% i 10% podanej dawki, co wskazuje, że wraz z wydłużaniem się łańcucha alkilowego w eterze wydajność tego procesu maleje (Green i wsp., 1989; Medinsky i wsp., 1990).



Ryc. 2. Tory metaboliczne EGAE (Morel i wsp., 1996; Corley i wsp., 2005).

W przypadku wchłaniania drogą inhalacyjną i pokarmową wydajność przemiany BE do glikolu etylenowego jest większa od wydajności sprzęgania z kwasem glukuronowym. W przypadku drogi skórnej proporcje te są odwrócone (Medinsky i wsp., 1990; Shyr i wsp., 1993).

Metabolitem EGAE jest również CO₂ powstający głównie z kwasu szczawiowego. Wydajność przemiany EGAE do tego związku wynosi 10-30%, 20% i 8-10% odpowiednio w przypadku ME, EE i BE, co wydaje się potwierdzać, że głównym źródłem CO₂ jest kwas szczawiowy (Medinsky i wsp., 1990).

Ostatnio odkryto beztlenową drogę metaboliczną BE. Polega ona na sprzęganiu tego związku z kwasami tłuszczowymi o długich łańcuchach węglowych przy udziale odpowiedniej syntazy. Biologiczna rola tej przemiany nie jest znana (Kaphalia i wsp., 1996).

EGAE i ich metabolity są wydalane z moczem, powietrzem wydechowym i żółcią. Na przykład u człowieka stężenie BE szybko spada we wszystkich kompartmentach w wyniku procesu eliminacji (metabolizm i wydalanie), co wskazuje na brak kumulacji tego związku. Znajduje to potwierdzenie w wartościach takich parametrów farmakokinetycznych BE jak biologiczny okres półtrwania ($t_{1/2}$), klirens i objętość dystrybucji. Ich wartości wynoszą odpowiedni: 40 minut, 1.21 l/min i 54 l. Ilość niezmienionego BE w moczu nie przekracza 0,03% podanej dawki, natomiast ilość BAA odpowiada 17 – 55% podanej dawki tego związku (Johanson, 1986).

U szczurów Sprague–Dawley narażonych inhalacyjnie na BE o stężeniu 100 lub 500 mg/m³ przez 1 – 12 dni, stwierdzono, że całkowity klirens ustrojowy tego związku wynosił średnio 2.6 l/h zaś klirens nerkowy BAA 0,53 l/h, co stanowi około 15% nerkowego przepływu krwi (Johnson, 1994). W innym doświadczeniu myszy i szczury narażano na BE drogą oddechową w zakresie stężeń 0 – 1250 mg/m³ przez okres

18 miesięcy. Obserwowano szybszą eliminacją związku macierzystego i BAA u myszy niż u szczurów. Szybkość eliminacji BE rosła z wielkością narażenia, natomiast malała szybkość wydalania BAA. Samice szczurów znacznie wolniej eliminowały BAA z krwi niż samce. Szybkość eliminacji BE i BAA malała z czasem trwania narażenia i z wiekiem zwierząt tak w przypadku myszy jak i szczurów (Dill i wsp., 1998). Ponadto, $t_{1/2}$ kwasu metoksyoctowego (MAA) w osoczu krwi szczurów samców był dłuższy ($13,2 \pm 0,4$ godz.) niż kwasu etoksyoctowego (EAA) ($9,4 \pm 3,7$ godz). Również całkowity klirens ustrojowy MAA był niższy od klirensu EAA (Aasmoe i wsp., 1997). $T_{1/2}$ MAA w moczu ludzi jest bardzo długi i wynosi 77,1 godz. U pracowników narażonych na ME na stałym poziomie $13,5 \text{ mg/m}^3$ przez 6 kolejnych dni, po jednym tygodniu przerwy w narażeniu, stężenie MAA w moczu istotnie wzrosło z $10,6 \text{ mg/g}$ kreatyniny (poniedziałek przed rozpoczęciem pracy) do $45,6 \text{ mg/g}$ kreatyniny (sobota po pracy) (Shih i wsp., 2001). Dane te wskazują, że MAA jest kumulowany w organizmie, przeciwnie do BAA. Z drugiej strony Ghanayem i wsp. (1987) wykazali brak jakościowych i ilościowych zmian w eliminacji BE u szczurów w warunkach powtarzanego narażenia kilkudniowego w porównaniu do zwierząt otrzymujących ten związek w dawce jednorazowej.

1.3 Toksyczność ostra EGAE.

Układami krytycznymi w ostrym i przewlekłym zatruciu EGAE są układ nerwowy, układ rozrodczy, szpik kostny, krew obwodowa i nerki.

Objawami ostrego zatrucia EGAE jest podrażnienie błon śluzowych górnych dróg oddechowych i oczu oraz depresja ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (Dodd i wsp., 1983; Corley, 1997). W przypadku ME dochodzi do uszkodzenia nabłonka plemnikotwórczego jąder (Ku i wsp.,

1994). O ile działanie drażniące i zmiany ze strony OUN są wywołane przez związki macierzyste, to zaburzenia w pozostałych układach i narządach są wynikiem toksycznego działania metabolitów EGAE (Carpenter i wsp., 1956; Ghanayem, 1989; Ghanayem i Sullivan, 1993).

Toksyczność ostra EGAE, oprócz upośledzonej koordynacji ruchowej i depresji OUN, manifestuje się wewnątrznaczyniową hemolizą prowadzącą do redukcji liczby erytrocytów, spadku hematokrytu, wzrostu średniej objętości krwinek oraz spadku stężenia hemoglobiny we krwi i wzrostu jej stężenia w surowicy. Zmiany te osiągają wartości maksymalne pomiędzy 6 i 24 godz. po podaniu lub pobraniu EGAE. W późniejszym czasie dochodzi do wzrostu liczby retikulocytów, co wskazuje na wzmożoną odnowę komórek szeregu erytrocytarnego w szpiku (Bartnik i wsp., 1987; Ghanayem i wsp., 2001; Koshkaryev i wsp., 2003).

Większość obrzmiałych i uszkodzonych erytrocytów jest usuwana z układu krążenia przez śledzionę, co manifestuje się wzrostem względnej masy tego narządu (Ghanayem i wsp., 1987; Dill i wsp., 1998).

Wyżej wymienione zmiany hematologiczne są wynikiem m.in. zaburzeń reologicznych erytrocytów tj. wzrostu ich sztywności i upośledzonej zdolności do odkształcania się (Udden, 2000). Zmiany te są jednym z czynników prowadzących do hemolizy, rozsianej zakrzepicy w płucach, siatkówce, wątrobie, sercu, śledzionie, kościach i zębach (Ghanayem i wsp., 2001; Ezov i wsp., 2002). Dochodzi również do uszkodzenia nerek, jako powikłania wtórnego, w wyniku niedrożności kanalików nerkowych spowodowanej złogami hemoglobinowymi. Pojawiają się bowiem złogi hemosydersyny i wałeczki hemoglobinowe w świetle kanalików nerkowych, a z czasem może dojść do ciężkiego uszkodzenia nerek w wyniku martwicy komórek nabłonka kanalikowego (Tyler, 1984, Ghanayem i wsp., 1987; Ghanayem i Salliwana, 1993; Burkhart i Donovan, 1998).

Podczas sekcji zwierząt, którym podano IPE lub BE w dawkach letalnych obserwowano wybroczyny krwawe w płucach, ciemną i powiększoną śledzionę (przekrwienie bierne), przekrwienie wątroby i uszkodzenie nerek (śródmiąższowe zapalenie nerek, wałeczki szkliste, obecność hemoglobiny w kanalikach nerkowych) oraz ciężką hemoglobinurię (Tanii i wsp., 1992; Nyska i wsp., 1999).

Ostra ekspozycja inhalacyjna myszy i szczurów na pary BE o stężeniu 500-975 mg/m³ prowadziła do zaburzeń oddechowych (spadek częstości akcji oddechowej) prawdopodobnie w wyniku kwasicy metabolicznej (Rowe i wsp., 1994).

W tabeli 4 i 5 podano wartości medialnych dawek śmiertelnych (LD₅₀) dla ME, EE, IPE i BE u różnych gatunków zwierząt (Carpenter i wsp., 1956; Smyth, 1969; Dodd i wsp., 1983; Tanii i wsp., 1992; Rowe i wsp., 1994; RTECS, 2001).

Tabela 4. Wartości medialnych dawek śmiertelnych dla ME.

Droga podania	Gatunek zwierząt	LD ₅₀ (mg/kg m.c.)	Piśmiennictwo
2-Metoksyetanol			
doustne	myszy	3900	Carpenter, 1956
	szczury	2300	Carpenter, 1956
	króliki	890	Carpenter, 1956
na skórę	króliki	1290	Carpenter, 1956
inhalacyjna	myszy	4600 (7 godz.)	Carpenter, 1956

Tabela 5. Wartości medialnych dawek śmiertelnych dla EE, IPE i BE.

Droga podania	Gatunek zwierząt	LD ₅₀ (mg/kg m.c.)	Piśmiennictwo
2-Etoksyetanol			
doustne	myszy	2450	Rowe, 1994
	szczury	3530	Rowe, 1994
	króliki	3100	Rowe, 1994
na skórę	króliki	3100	Rowe, 1994
inhalacyjna	myszy	6700 (7 godz.)	Rowe, 1994
2-Izopropoksyetanol			
dożołądkowa	szczury	500 – 1000	Tanii i wsp., 1992
	myszy	4900	RTECS, 2001
	myszy (samce)	2000	Tanii, 1992
inhalacyjna	szczury	3100 (4 godz.)	RTECS, 2001
	myszy	8203 (7godz.)	RTECS, 2001
dootrzewnowa	szczury	800	RTECS, 2001
	myszy	1860	RTECS, 2001
na skórę	króliki	1444	Smyth, 1969
2-Butoksyetanol			
dożołądkowa	szczury	530 – 3000	Carpenter, 1956
	króliki	350	Carpenter, 1956
inhalacyjna	szczury (4 godz.)	450	Dodd, 1983
	myszy (7 godz.)	3444	Rowe, 1994
na skórę	króliki	400 – 500	Carpenter, 1956
	świnki morskie	2000	RTECS, 2001

1.4 Toksyczność przewlekła EGAE.

Niezależnie od drogi narażenia, toksyczność przewlekła EGAE, manifestuje się spadkiem dynamiki przyrostu masy ciała zwierząt, wzrostem względnej masy wątroby i nerek oraz zmianami hematologicznymi w wyniku zwiększonej łamliwości erytrocytów i ich wewnątrznaczyniowej hemolizy. Wskazują na to wyniki m.in. dwóch doświadczeń przeprowadzonych na szczurach. W pierwszym doświadczeniu szczurom podawano w paszy BE w dawkach 1500 lub 7500 mg/kg/dzień przez 13 tygodni. W drugim doświadczeniu szczury narażano na IPE w stężeniach 0, 604, 1874, 3787 mg/m³/dzień przez 4 tygodnie (Dodd i wsp., 1983; Samuels i wsp., 1984).

Toksyczność przewlekła EGAE ma istotne znaczenie w warunkach narażenia zawodowego. Liczni autorzy opisują przypadki narażenia zawodowego na EGAE i jego skutki. Shih i wsp. (2001) u 47 pracowników zawodowo narażonych na ME o stężeniu 107,1±23,4 mg/m³, przez 2,6 lat, obserwowali wyraźne zmiany hematologiczne we krwi obwodowej wyrażone redukcją liczby erytrocytów, spadkiem hematokrytu i stężenia hemoglobiny. Częstość występowania niedokrwistości w grupie narażonej (26,1%) była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej (3,2%). Po standaryzacji wyników na płeć, wskaźnik masy ciała (BMI) i czas trwania zatrudnienia liczba erytrocytów ujemnie korelowała ze stężeniem ME w powietrzu. Ponadto, liczba erytrocytów, wartość hematokrytu i stężenie hemoglobiny ujemnie korelowały ze stężeniami MAA w moczu. Podobne, szkodliwe zmiany obserwowano u pracowników drukarni narażonych na ME o stężeniu 190 – 1230 mg/m³ przez 9 – 10 godzin/dzień, 6 dni w tyg. przez kilka miesięcy. Stwierdzono u nich wyraźne zmiany hematologiczne we krwi obwodowej w porównaniu z nienarażoną grupą kontrolną. Zmiany te manifestowały się redukcją liczby erytrocytów, spadkiem hematokrytu i stężenia

hemoglobiny we krwi obwodowej. Odsetek osób narażonych na ME z objawami niedokrwistości hemolitycznej wynoszący 42% był statystycznie znamienne wyższy niż w grupie kontrolnej (3% osób). Zmiany te cofały się całkowicie gdy narażenie na ME obniżono najpierw do 8 mg/m^3 , a następnie do $1,7 \text{ mg/m}^3$ (Shih i wsp., 2003).

W innym badaniu oceniono skutki narażenia na ME i EE na układ rozrodczy u mężczyzn. W tym celu przebadano nasienie pobrane od 73 osób zawodowo narażonych na te związki. Pracownicy ci byli narażeni na ME o stężeniu $0-17,7 \text{ mg/m}^3$ i EE o stężeniu $0-80,5 \text{ mg/m}^3$. U badanych mężczyzn stwierdzono oligospermię i azospermię (Welch i wsp., 1988). Podobne badania przeprowadzono w grupie 37 mężczyzn narażonych na EE w zakresie stężeń do 84 mg/m^3 . U osób narażonych, w porównaniu z grupą kontrolną (39 osób) wykazano wyraźne różnice w jakości nasienia wyrażone redukcją liczby plemników oraz obecnością plemników o nieprawidłowych kształtach (Ratcliffe i wsp., 1989).

U kobiet przewlekle narażonych na niskie stężenia BE w fabryce opakowań na napoje stwierdzono istotny wzrost hematokrytu i średniego stężenia hemoglobiny w krwinkach (MCHC), natomiast nie wykazano zmian w innych wskaźnikach hematologicznych w porównaniu z grupą kontrolną (Haufroid i wsp., 1997).

1.5 Odległe skutki działania EGAE (działanie genotoksyczne, gonadotoksyczne, embrio – i fetotoksyczne oraz teratogenne).

Genotoksyczność EGAE oraz ich metabolitów nie jest do końca zbadana. Chiewchanwit i Au (1994) wykazali, że aldehyd metoksyoctowy (MALD), metabolit ME, w stężeniu $10 - 40 \text{ mM/l}$ podczas 48 godzinnej inkubacji lub w stężeniach $0,05 - 2,5 \text{ mM/l}$ w 24 godzinnej inkubacji indukował wymianę chromatyd siostrzanych w limfocytach ludzkich. ME

w tym samym modelu doświadczalnym nie powodował aberracji chromosomalnych. Hoflack i wsp. (1995) porównali genotoksyczność EGAE w teście Amesa u *Salmonella typhimurium* TA 97a, TA98, TA100, TA102 w obecności lub bez frakcji S9. W doświadczeniu użyto ME, EE, BE oraz ich metabolity w stężeniu do 10 mg/płytkę. Wszystkie badane związki dały negatywny wynik z TA98, TA 100, TA102 w obecności lub bez frakcji S9. Jedynie BE i MALD w najwyższych stężeniach (tj. odpowiednio 2,2 mg/płytkę i 2,5 mg/płytkę) wykazały niewielki mutageny potencjał u TA 97a.

W badaniach nad genotoksycznym działaniem BE nie obserwowano mutacji oraz wymiany chromatyd siostrzanych w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO) przy stężeniach do 0,25% podczas 2 godzinowego narażenia w obecności układu aktywującego jak również w doświadczeniu 5 godzinnym bez udziału tego układu (Mc Gregor, 1984). U szczurów, którym podawano BE dożołądkowo w jednorazowej dawce 120 mg/kg oraz u transgenicznych myszy nosicieli onkogenu *v-Ha-ras*, które otrzymywały ten związek podskórnie codziennie, przez 2 tygodnie w łącznej dawce 1500 mg/kg, nie stwierdzono podwyższonego stężenia adduktów DNA i 5-metylodeoksytyozyny, nasilonej metylacji protoonkogenów *ras* oraz wzrostu częstości występowania nowotworów w porównaniu z grupą kontrolną po 120 dniach od zakończenia narażenia (Keith i wsp., 1996). Również IPE nie wykazywał działania mutagennego w testach mutacji powrotnych u bakterii *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) i *Escherichia coli* WP2 *uvrA* zarówno bez udziału, jak i z udziałem układu aktywującego metabolicznie (Wagner, 1996).

Na podstawie przytoczonych danych można stwierdzić, że przebadane EGAE nie posiadają właściwości genotoksycznych.

O toksyczności EGAE decydują głównie ich metabolity tj. odpowiednie kwasy alkoksyoctowe. Foster i wsp. (1987) wykazali, że MAA w dawkach 138–695 mg/kg/dzień oraz EAA w zakresie dawek 151–754 mg/kg/dzień powodowały znaczną redukcję spermatocytów w fazie pachytenu, nie wpływając na komórki rozrodcze w innych fazach mejotycznego podziału. W tym samym doświadczeniu stwierdzono, iż BAA jedynie w najwyższej zastosowanej dawce tj. 877 mg/kg/dzień powodował niewielki spadek liczby spermatocytów (nie podano ich fazy podziału), co odzwierciedla jego słabe i niespecyficzne działanie cytotoksyczne. Uzyskane wyniki były zbieżne z wynikami Ghanayem'a i Chapin'a (1990), którzy podając ME samcom szczura w dawce 200 mg/kg wykazali, iż spermatocyty w fazie pachytenu są najbardziej wrażliwe na toksyczne działanie tego eteru.

W innym badaniu, gdy myszy Swiss CD-1 otrzymywały w wodzie do picia BE w dawkach 0, 720, 1350 lub 2100 mg/kg/dzień przez 7 kolejnych dni u samców nie obserwowano zmian masy jąder i najądrzy oraz ruchliwości plemników (Heindel i wsp., 1990). Również Doe (1984) oraz Samuels i wsp., (1984) nie stwierdzili żadnych zmian makroskopowych i histopatologicznych w jądrach szczurów narażonych na IPE w stężeniach 1275 i 4250 mg/m³ przez 6 godz/dzień przez 2 tygodnie ani po jednorazowym narażeniu na wysokie stężenie (14875 mg/m³) tego związku. Na podstawie tych badań stwierdzono, że siła działania gonadotoksycznego EGAE maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego grupy alkoksylowej.

EGAE oceniano również pod względem działania embriotoksycznego, fetotoksycznego i teratogennego. Ciężarne szczury F344 i białe króliki nowozelandzkie eksponowano na pary BE o stężeniu 0, 125, 250, 500 lub 1000 mg/m³ przez 6 godzin dziennie, pomiędzy 6–15 (szczury) lub 6–18 dniem ciąży (króliki) tj. w okresie organogenezy. U samic eksponowanych

na BE o stężeniu 500 i 1000 mg/m³ i u ich potomstwa wystąpiły objawy działania toksycznego i embriotoksycznego (wzrost liczby resorpcji, spadek liczby żywych implantacji w miocie) oraz fetotoksycznego (opóźnienie kostnienia szkieletu). Natomiast nie obserwowano wad wrodzonych u potomstwa w żadnej grupie zwierząt. BE przy niższych stężeniach tj. 125 i 250 mg/m³ nie wywierał działania toksycznego na organizmy matek i ich potomstwa. U królików narażonych na najwyższe stężenie BE (1000 mg/m³) wystąpiły objawy toksyczności matczynej (śmierć samic, poronienia, spadek masy ciała i masy macicy łącznie z płodami) oraz embriotoksyczności (redukcja liczby implantacji ogółem i żywych implantacji w miocie) (Tyl i wsp., 1984). W innym doświadczeniu, szczury samice szczepu Sprague – Dawley narażano drogą oddechową na IPE o stężeniu 0, 425, 1275 i 2550 mg/m³ przez 10 kolejnych dni (od 6 do 15 dnia ciąży). Przy najwyższym stężeniu (2550mg/m³) stwierdzono istotne obniżenie masy ciała matek oraz spadek liczby implantacji w przeliczeniu na miot (Tyl, 1997). Powyższe badania wskazują, że EGAE wywierają działanie embriotoksyczne i fetotoksyczne.

Dostępne piśmiennictwo nie zawiera danych na temat rakotwórczego działania EGAE u ludzi. Istnieją jedynie nieliczne dane na temat rakotwórczego działania BE u zwierząt. Podprzewlekłe narażenie na BE powoduje wzrost ryzyka raka wątroby u gryzoni (Krasavage, 1986; Dill 1998). Zasugerowano, że działanie to jest wtórnym efektem wywołanym przez ten związek. W wyniku wewnątrznaczyniowej hemolizy dochodzi do uwalniania żelaza i odkładania go w postaci hemosyderyny w komórkach Borowicza-Kupffera (Dill, 1998). W następstwie przeładowania tych komórek żelazem dochodzi do nasilenia reakcji Fentona i Haber-Weissa generujących reaktywne formy tlenu (ROS) w tym – rodnika hydroksylowego. Rodniki te przy niedostatecznej podaży antyoksydantów utleniają takie składniki komórki jak kwasy nukleinowe, białka, cukry i

lipidy. Ponadto, czynniki wzrostu uwalniane z komórek Borowicza-Kupffera nasilają proliferację hepatocytów oraz hamują procesy apoptozy, co może być przyczyną powstawania raka wątrobowo-komórkowego u gryzoni (Henle i wsp., 1996; Nyska i wsp., 2002; Corthals i wsp., 2006).

1.6 Działanie toksyczne na krew obwodową.

Działanie toksyczne EGAE na krew obwodową i układ krwiotwórczy prowadzi do gwałtownej hemolizy wewnątrznaczyniowej. W zależności od rodzaju podanego lub pobranego EGAE zmiany we krwi obwodowej wykazują różnice jakościowe i ilościowe.

U szczurów, którym podawano ME w wodzie do picia (w dawce 100 i 500 mg/kg/dzień) przez 4 kolejne dni obserwowano nieznaczną redukcję liczby erytrocytów, spadek hematokrytu i stężenia hemoglobiny całkowitej w 4 i 8 dniu po podaniu tego związku. W 8 dniu dochodziło do wzrostu liczby retikulocytów. Ponadto, ME w najwyższej dawce (500 mg/kg/dzień) powodował zmiany w układzie białokrwinkowym wyrażone znaczną redukcją liczby limfocytów i neutrofilii (Grant i wsp., 1985).

U szczurów, którym podawano BE (w dawce 500 i 1000mg/kg/dzień) przez 4 kolejne dni obserwowano wyraźne zmiany w obu układach krwinkowych, na każdym poziomie dawkowania. Dochodziło do redukcji liczby erytrocytów, spadku hematokrytu i stężenia hemoglobiny oraz wzrostu objętości erytrocytów, średniej masy hemoglobiny w krwince oraz liczby retikulocytów. W układzie białokrwinkowym obserwowano spadek liczby leukocytów ogółem, będący wynikiem redukcji głównie limfocytów (Grant i wsp., 1985). Powodem tych zjawisk było drastyczne skrócenie biologicznego czasu półtrwania krwinek. Ponadto, w rozmazach krwi obserwowano wzrost liczby segmentowanych leukocytów i erytroblastów. Zmianom tym towarzyszyła zwiększona liczba erytrocytów

polichromatycznych oraz komórek wykazujących poikilocytozę (Ghanayem i wsp., 2001).

Ghanayem i wsp. (2000) wykazali, iż działanie toksyczne BE jest zróżnicowane i związane z płcią. Porównali oni wrażliwość erytrocytów samic i samców szczurów Fisher 344 na hemolityczne działanie BE w dawce 250 mg/kg podawanego przez 3 kolejne dni. Objawy ostrej niedokrwistości hemolitycznej wystąpiły zarówno u samców jak i u samic, jednakże u samic zmiany te pojawiły się wcześniej i były silniej zaznaczone niż u samców. Przyczyną tego zjawiska oprócz większej wrażliwości samych erytrocytów jest wolniejsza eliminacja z organizmu powstałych AAA u samic niż u samców.

Hemolityczne działanie EGAE zależy również od różnic gatunkowych i podatności erytrocytów na hemolizę. Erytrocyty gryzoni, a zwłaszcza szczurów, są bardziej wrażliwe od erytrocytów człowieka na hemolityczne działanie EGAE (Ghanayem i Sullivan, 1993; Udden i Patton, 1994).

Mechanizm hemolitycznego działania EGAE nie jest znany. Dotychczas wykazano, że związki te powodują spadek poziomu ATP w erytrocytach przy braku zmian aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i stężenia zredukowanego glutationu. Dodatek egzogenego ATP przeciwdziała hemolizie *in vitro* (Ghanayem, 1989).

Stwierdzono również, że w warunkach działania BAA wzrasta stężenie Na^+ i ilość wody w erytrocytach, co powoduje ich pęcznienie i pękanie. Zasugerowano, że zahamowanie aktywności ATPaz błonowych zaburza błonowy transport wody i elektrolitów (Udden, 2002).

2. Założenia i cel pracy.

Ostre działanie hemolityczne, zwłaszcza BE, zostało dobrze udokumentowane. Brak jest jednak szerszych badań porównawczych nad hemolitycznym działaniem EGAE. Dostępne dane z piśmiennictwa na temat metabolizmu tych związków wskazują, że powinny one wywoływać zróżnicowane działanie hemolityczne.

Dotychczas nie stworzono jasnej koncepcji możliwych mechanizmu(ów) hemolizy indukowanej przez te związki. Istniejące dane na temat zmian reologicznych erytrocytów oraz zaburzeń homeostazy jonowej w tych komórkach pod wpływem kwasów alkoksyoctowych – metabolitów EGAE wskazują na celowość badań nad wpływem tych kwasów na aktywność ATPaz w błonach erytrocytów.

Podjęcie pracy mającej na celu porównanie siły hemolitycznego działania eterów glikolu etylenowego i ich metabolitów *in vivo* i *in vitro* oraz mechanizmów tego działania wynikało z następujących przesłanek:

- częstego zastosowania EGAE w przemyśle farb i lakierów, przemyśle chemicznym, kosmetycznym, farmaceutycznym i w gospodarstwie domowym, co może prowadzić do narażenia ludzi na te związki;
- braku systematycznych badań na temat zależności dawka – efekt odnośnie hemolitycznego działania EGAE;
- braku wystarczających danych odnośnie mechanizmów odpowiedzialnych za hemolityczne działanie EGAE.

Na podstawie powyższych założeń przyjęto następujące cele badawcze:

- ❖ Porównanie siły działania hemolitycznego ME, EE, IPE i BE u szczurów po jednorazowym, podskórnym podaniu tych związków, (zatrucie ostre);

- ❖ Ocenę ochronnego działania pirazolu, 4-metylopirazolu i etanolu, jako czynników hamujących metabolizm EGAE w ostrym zatruciu BE, jako substancją modelową;
- ❖ Porównanie hemolitycznego działania kwasów alkoksyoctowych, a mianowicie: kwasu metoksyoctowego (MAA), etoksyoctowego (EAA), propoksyoctowego (PAA), butoksyoctowego (BAA) i pentoksyoctowego (PEAA) na krwinki ludzkie i szczurze *in vitro*;
- ❖ Ocenę hamującego działania kwasów alkoksyoctowych na aktywność komercyjnej Na^+/K^+ -ATPazy oraz ATPaz w cieniach erytrocytów ludzkich i szczurzych *in vitro*, a w szczególności $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy (ATPaza całkowita), Na^+/K^+ -ATPazy i Ca^{2+} -ATPazy (Mg^{2+} -ATPazy = $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy - Na^+/K^+ -ATPazy).

3. Materiały i metody

3.1 Odczynniki

- ME, EE, IPE, BE, MAA, EAA, PY, MP, $\text{ATPNa}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Na^+/K^+ -ATPaza z kory mózgowej świni, α -celuloza i makroceluloza pochodziły z firmy Sigma – Aldrich Ltd., Polska;
- PAA, BAA i PEAA zostały zsyntetyzowane w Katedrze Technologii i Biotechnologii Chemicznych Środków Leczniczych CMUJ pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Kieć – Kononowicz;
- Odczynnik Drabkina i wzorzec hemoglobiny pochodziły z łódzkiej firmy „Aqua – Medica”;
- etanol rektyfikowany;
- kwas nadchlorowy (PCA), 0,6 M;
- kwas trichlorooctowy (TCA), 60%;
- Bufory do izolacji cieni erytrocytów szczurzych i ludzkich oraz do oznaczenia aktywności ATPaz błonowych zostały przygotowane w Zakładzie Biochemii Toksykologicznej CMUJ na bazie odczynników produkcji POCH (Polska). Były to:
 - I. bufor do płukania i inkubacji erytrocytów wg Uddena (2002): 100 mmol/l Tris o pH 7,4, 140 mmol/l NaCl, 4,0 mmol/l KCl, 2,0 mmol/l CaCl_2 , 10 mmol/l glukozy i 0,1 % albuminy wołowej;
 - II. bufor hemolizujący erytrocyty ludzkie i szczurze wg Dicka (1969): 4 mmol/l Tris – HCl, 1 mmol/l EGTA (pH 7,4);
 - III. bufor do płukania i rozcieńczania cieni erytrocytów ludzkich i szczurzych wg Rybczyńskiej (1984): 10 mmol/l Tris – HCl, 1 mmol/l EDTA (pH 7,5);
 - IV. bufor do oznaczania aktywności Na^+/K^+ -ATPazy wg Yucebilgic (2003): 30 mmol/l Tris – HCl o pH 7,4, 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 6 mmol/l MgCl_2 , 0,1 mmol/l EDTA;

V. bufor do oznaczania aktywności Ca^{2+} -ATPazy wg Yucebilgic (2003):

30 mmol/l Tris – HCl o pH 7,4, 6 mmol/l MgCl_2 , 0,15 mmol/l CaCl_2 ,
0,1 mmol/l EDTA;

VI. bufor do oznaczania aktywności $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy wg Rybczyńskiej

(1984): 100 mmol/l Tris – HCl o pH 7,4, 6 mmol/l, MgCl_2 , 20 mmol/l
KCl, 100 mmol/l NaCl, 0,2 mmol/l EDTA.

3.1.2 Synteza kwasów alkoksyoctowych (PEAA, BAA, PAA)

PEAA, BAA i PAA otrzymano zmodyfikowaną metodą Rule i wsp. (1928). Do alkoholowych (pentanolowego, butanolowego lub propanolowego) roztworów sodu dodawano 0,5 stechiometrycznej ilości kwasu chlorooctowego (w przeliczeniu na sól). Produkty reakcji oczyszczano przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem i kilkakrotne przemywanie zgodnie z ich właściwościami fizykochemicznymi.

PEAA: 4,6 g (0,2 mola) sodu rozpuszczano w gorącym n-pentanolu (50 ml) ciągle mieszając. Następnie dodawano kroplami 9,45 g kwasu chlorooctowego (0,1 mola) rozpuszczonego w 25 ml n-propanolu. Zawiesinę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny stale mieszając. Na drugi dzień dodawano 100 ml wody do mieszaniny reakcyjnej i otrzymany roztwór dwukrotnie ekstrahowano eterem dietylowym (50 ml). Warstwę wodną zakwaszono 25% H_2SO_4 . Produkt reakcji ekstrahowano eterem, warstwę eterową osuszano bezwodnym Na_2SO_4 , a eter odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem (temp. wrzenia 230-233°C). Otrzymane produkty oczyszczano przez rozpuszczenie w chlorku metylu i ekstrakcje do 2% roztworu NaOH, ponowne zakwaszenie 25% H_2SO_4 i ekstrakcję do chlorku metylenu. Po odparowaniu chlorku metylenu otrzymywano czysty produkt w ilości 1g.

W przypadku BAA stosowano n-butanol (75 ml). Temp. wrzenia produktu 153-156°C, zaś jego ilość 4,6 g.

PAA otrzymano podobnie jak PEAA stosując n-propanol w ilości 75 ml. Temp. wrzenia produktu 180-186°C, otrzymana ilość 3 g.

Tożsamość otrzymanych produktów potwierdzono wynikami analizy spektralnej (¹H-NMR) oraz elementarnej.

3.2 Zwierzęta laboratoryjne

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar CRL: (WI) WUBR, samcach, w wieku 10 – 12 tygodni, pochodzących ze Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UJ w Krakowie. Badania te uzyskały akceptację Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie (Nr opinii 80/OP/2001 z dnia 04.10.2001).

Przed doświadczeniem szczury przez okres około 10 dni poddawano kwarantannie. Zwierzęta podzielone losowo na grupy liczące po 5 szczurów przebywały w oddzielnych, plastikowych klatkach. Szczury karmiono dietą standardową (Murigan) i pojoło wodą wodociągową *ad libitum*. Zarówno w okresie kwarantanny jak i podczas doświadczenia szczury przebywały w pomieszczeniu o temperaturze 21- 24°C i wilgotności względnej 40 – 60% w cyklu dobowym światło/ciemność 12/12godzin (światło 06.00 – 18.00).

3.3 Przebieg doświadczenia *in vivo*

Szczury w grupach liczących po 5 zwierząt otrzymywały podskórnice badane etery w następujących, jednorazowych dawkach:

- ME – 0, 2,5, 5,0 i 10,0 mmol/kg m.c.
- EE – 0, 2,5, 5,0 i 10,0 mmol/kg m.c.
- IPE – 0, 0,625, 1,25, 2,5 i 5,0 mmol/kg m.c.
- BE – 0, 0,625, 1,25, 2,5 i 5,0 mmol/kg m.c.

Zwierzęta otrzymywały świeżo przygotowane roztwory badanych eterów na bazie soli fizjologicznej o objętości 2 ml/kg.

Dawki badanych związków dobrano w ten sposób, aby nie doprowadzić do śmierci szczurów oraz aby uzyskać wyraźne objawy hemolizy wewnątrznaczyniowej.

Bezpośrednio przed podaniem badanych roztworów oraz po 3, 6, 24, 48 i 144 godz. po ich podaniu pobierano krew z koniuszka ogona do probówek firmy Eppendorf i do kapilar hematokrytowych celem pozyskania osocza do oznaczeń hemoglobiny osoczowej (HGB_o). W przypadku zwierząt otrzymujących IPE czas pobierania krwi wydłużono do 216 godz. trwania doświadczenia, tj. do całkowitego cofnięcia się zmian hematologicznych.

3.3.1 Badania hematologiczne

Zakres badań hematologicznych obejmował: liczbę erytrocytów (RBC), liczbę retikulocytów (Ret.), hematokryt (Ht), stężenie hemoglobiny całkowitej (HGB), stężenie hemoglobiny osoczowej (HGB_o), objętość erytrocytów (MCV), średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach (MCHC) i średnią masę hemoglobiny w krwince (MCH). Wszystkie wskaźniki hematologiczne, z wyjątkiem Ret. i HGB_o oznaczono za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego Cobas Micros firmy ROCHE. Stężenie HGB_o w osoczu otrzymanym przez wirowanie próbek krwi w kapilarach hematokrytowych oznaczono metodą Drabkina. Ret. liczono w mikroskopie świetlnym po wybarwieniu rozmazów krwi błękitem brylantowo-krezyłowym.

Badania hematologiczne były systematycznie kontrolowane przez ocenę sprawności analizatora hematologicznego. W tym celu stosowano standardową krew ludzką CBC-3D Hematology Control (R&D System INC., Minneapolis, USA). Precyzja oznaczeń RBC, Ht i MCV w dłuższym okresie czasu (n=30) wynosiła odpowiednio 4,2%, 4,5%, 4,4%.

Szczury otrzymujące BE w dawce jednorazowej 5,0 mmol/kg umieszczano w klatkach metabolicznych typu Simax i zbierano mocz w pierwszej dobie, w którym oznaczono stężenie hemoglobiny i kreatyniny. Stężenie hemoglobiny oznaczano metodą Drabkina, natomiast kreatyniny metodą z odczynnikiem Jaffego.

3.4 Ocena wpływu etanolu, pirazolu i metylopirazolu na przebieg ostrej hemolizy indukowanej przez BE

Szczury w grupach liczących po 5 zwierząt otrzymywały podskórną BE w jednorazowej dawce 0 lub 1.25 mmol/kg m.c. W innych grupach szczury otrzymywały dootrzewnowo PY lub MP w jednorazowych dawkach 0.045, 0.09, 0.18 lub 0.36 mmol/kg. Związki te podawano równocześnie z BE, dwie godziny przed lub pięć godzin po podskórnym podaniu tego związku w jednorazowej dawce 1,25 mmol/kg.

Świeżo sporządzone roztwory BE, PY lub MP w soli fizjologicznej podawano o objętości 2 ml/kg.

W innych grupach doświadczalnych szczury otrzymywały podskórną BE w jednorazowej dawce 2,5 mmol/kg oraz etanol dożołądkowo w dawce 2,5 g/kg (w objętości 10 ml/kg). Etanol podawano 15 min. przed podskórnym wstrzyknięciem BE lub 2 krotnie: 15 min. przed i 3 godz. po podaniu tego związku..

Bezpośrednio przed podaniem badanych roztworów oraz po 3, 6, 24 i 48 godzinach po ich podaniu pobierano krew z koniuszka ogona szczurów do badań hematologicznych.

Zakres badań hematologicznych i metodyka badań były takie same jak w pkt. 3.3.1.

3.5 Przebieg doświadczenia *in vitro*

3.5.1 Izolacja erytrocytów szczurzych i ludzkich

Krew do badań *in vitro* pobierano od szczurów w narkozie tiopentalowej (65 mg tiopentalu/kg m.c. w 1 ml soli fizjologicznej). Krew pobierano na heparynę przez punkcję lewej komory serca do całkowitego skrwawienia szczurów.

Krew ludzka pochodziła ze stacji krwiodawstwa Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Krew tę pobierano do vacutainerów z żyły łokciowej od różnych dawców. Jako środek przeciwkrzepliwy stosowano heparynę.

Krew szczurzą lub ludzką wirowano przez 10 min przy 1000 g, po czym usuwano osocze i kożuszek leukocytarny, a otrzymane krwinki przemywano 3 – krotnie buforem Uddena (I).

3.5.2 Ocena hemolitycznego działania kwasów alkoksyoctowych na erytrocyty szczurze i ludzkie

Przemyte krwinki szczurze lub ludzkie zawieszano w buforze Uddena (I), w takim stosunku, aby hematokryt wynosił ok. 20 %.

Inkubację krwinek z roztworami kwasów alkoksyoctowych w zakresie stężeń podanych w tabeli 6 przeprowadzono następująco:

Do próbek polipropylenowych z korkiem o objętości 7,0 ml wprowadzano po 1,0 ml zawiesiny krwinek szczurzych lub ludzkich. Do kolejnych próbek dodawano 20 μ l 0,9% NaCl (kontrola) lub taką samą objętość roztworów MAA lub EAA w soli fizjologicznej. Do pozostałych próbek dodawano po 20 μ l roztworów PAA, BAA lub PEAA otrzymanych przez rozpuszczenie badanych kwasów w mieszaninie soli fizjologicznej i BE w stosunku 1:1 ze względu na lipofilowość tych kwasów.

Próbówki umieszczano w łaźni wodnej, w temp. 37°C ciągle mieszając (łaźnia wodna z wytrząsarką typ Elpan 357) na okres 3 godz. Bezpośrednio przed inkubacją oraz po 1, 2 i 3 godz. inkubacji oznaczano RBC, Ht oraz MCV za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego COBAS MICROS firmy ROCHE.

Tabela 6. Stężenia roztworów kwasów alkoksyoctowych zastosowane w badaniach *in vitro*.

Metabolit	Stężenie (mmol/l)	
	krwinki szczurza	krwinki ludzkie
MAA	0 – 16,0	0 – 30,0
EAA	0 – 15,0	0 – 25,0
PAA	0 – 10,0	0 – 20,0
BAA	0 – 5,5	0 – 18,0
PEAA	0 – 6,0	0 – 16,0

Hemolityczne działanie kwasów alkoksylowych *in vitro* zostało wyrażone efektywnymi stężeniami kwasów, które powodowały spadek liczby RBC i Ht lub wzrost MCV o 25% (EC₂₅) lub 50% (EC₅₀) w stosunku do wartości wyjściowych.

3.6 Izolacja błon erytrocytów szczurzych i ludzkich do oznaczania ATPaz

Izolację erytrocytów szczurzych lub ludzkich z krwi pełnej przeprowadzono metodą kolumnową wg Beutler'a (1984) w celu usunięcia krwinek białych i płytek krwi. Wypełnienie kolumny stanowiła równowagowa mieszaninę α -celulozy i makrocelulozy, którą zawieszano w 0,9 % NaCl i umieszczano w szklanej strzykawce o pojemności 10 ml, jako kolumnie chromatograficznej ustawionej w pozycji pionowej. Pełną krew szczurzą lub ludzką o objętości do 6 ml, pobraną na heparynę наносzono na tak przygotowaną kolumnę. Eluent zbierano do kalibrowanej probówki z lodowatym 0,9 % NaCl i wirowano w temp 4°C przy 1000 g przez 15 min. Supernatant usuwano, a odwirowane erytrocyty zadawano 5-krotną objętością buforu hemolizującego (II). Hemolizat wirowano przez 20 min. w temp. 4°C przy 21000 g (wirówka chłodzona typ MPW – 375). Po odwirowaniu supernatant odrzucano, a osad błon erytrocytarnych płukano dodając 5 – krotną objętość buforu do płukania (III) w stosunku do objętości „cieni” erytrocytów. Zawiesinę błon wirowano przez 20 minut w temp. 4°C przy 19000 g. Czynność przemywania powtarzano wielokrotnie aż do uzyskania cielisto-różowej zawiesiny.

W próbkach tych oznaczano aktywności ATPaz po wcześniejszym oznaczeniu stężenia białka w cieniach erytrocytarnych m-dą Lowry i wsp. (1946) i doprowadzeniu jego stężenia do wartości 4,0 i 3,5 mg/ml odpowiednio w przypadku cieni erytrocytów szczurzych i ludzkich.

3.7 Oznaczanie aktywności Na^+/K^+ -ATPazy komercyjnej oraz ATPaz w cieniach erytrocytów szczurzych i ludzkich ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy,)

Przeprowadzono badania mające na celu określenie optymalnych warunków oznaczania aktywności trzech ATPaz tj. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy i Ca^{2+} -ATPazy. Aktywność Mg^{2+} -ATPazy obliczono z różnicy między aktywnością $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy i Na^+/K^+ -ATPazy.

Uzyskane wyniki dotyczące standaryzacji metod hematologicznych i biochemicznych celowo podano w części metodycznej (rozdz. 3.3.1; 3.6.1-3.6.5) wychodząc z założenia, że niniejsza rozprawa doktorska nie ma charakteru pracy metodycznej.

3.7.1 Oznaczanie fosforu nieorganicznego

Przebieg reakcji hydrolizy ATP przy udziale ATPaz obecnych w cieniach erytrocytów przeprowadzono w następujących warunkach:

Do 0,5 ml buforu do oznaczania ATPaz dodawano 0,25 ml zawiesiny cieni o stężeniu białka wynoszącym 4 mg/ml w przypadku cieni erytrocytów szczurzych i 3,5 mg w przypadku cieni erytrocytów ludzkich. Reakcję enzymatyczną uruchamiano przez dodanie 0,25 ml roztworu ATP o stężeniu 3 mmol/l, po czym inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temp. 37°C. Reakcję przerywano przez dodanie 1 ml 0,6 M PCA, a następnie odwirowywano osad przy 9000 g. W klarownym supernatancie oznaczono ilość nieorganicznego fosforu z wykorzystaniem reakcji barwnej z molibdenianem amonowym, zredukowanym do błękitu molibdenowego przez kwas askorbinowy. Kwaśne środowisko reakcji (bufor octanowy pH 4,0) chroni nadmiar ATP przed nieenzymatyczną hydrolizą (Tab. 7).

Oznaczanie stężenia fosforu nieorganicznego (P_i) wykonano następująco:

Do 0,5 ml klarownego supernatantu dodawano 2 ml buforu octanowego (pH 4,0), 0,2 ml molibdenianu amonu o stężeniu 1% w/v i 0,2 ml 1% w/v askorbinianu. Mieszaninę reakcyjną umieszczano na 20 min. w ciemnym miejscu, po czym mierzono absorbancję przy długości fali 660 nm wobec próby odczynnikowej (nie zawierającej P_i) (Tab. 8).

Tab. 7. Warunki hydrolizy ATP przy udziale ATPaz.

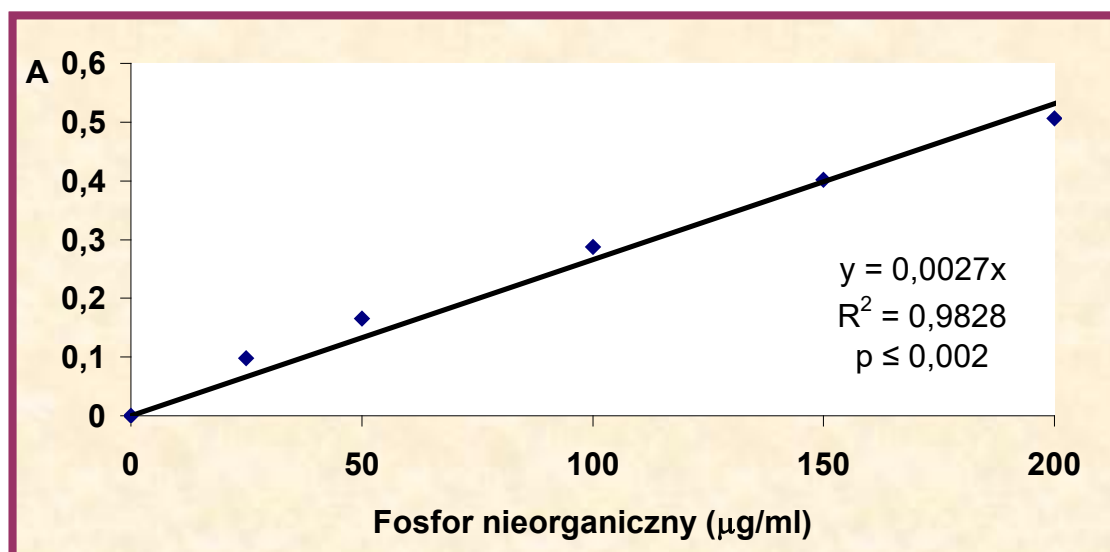
	Badana	Ślepa I	Ślepa II
Bufor do oznaczania ATPaz (ml)	0,5	0,75	1
Zawiesina cieni (ml)	0,25	—	—
Roztwór ATP (ml)	0,25	0,25	0,25
Inkubacja przez 30 min. w 37°C			
PCA (ml)	1	1	1

Stężenia ATP podano w pkt. 3.7.3.

Tab. 8. Metoda oznaczania fosforu nieorganicznego.

	Badana	Wzorzec	Ślepa
Supernatant (ml)	0,5	—	—
Wzorzec P_i (ml)	—	0,5	—
Woda redestylowana (ml)	—	—	0,5
Bufor octanowy (ml)	2	2	2
1% Molibdenian (ml)	0,2	0,2	0,2
1% Askorbinian (ml)	0,2	0,2	0,2

Na rycinie 3 przedstawiono krzywą kalibracyjną dla fosforu nieorganicznego.



Ryc. 3. Krzywa kalibracyjna fosforu nieorganicznego.

Parametry walidacyjne metody zebrano w tabeli 9.

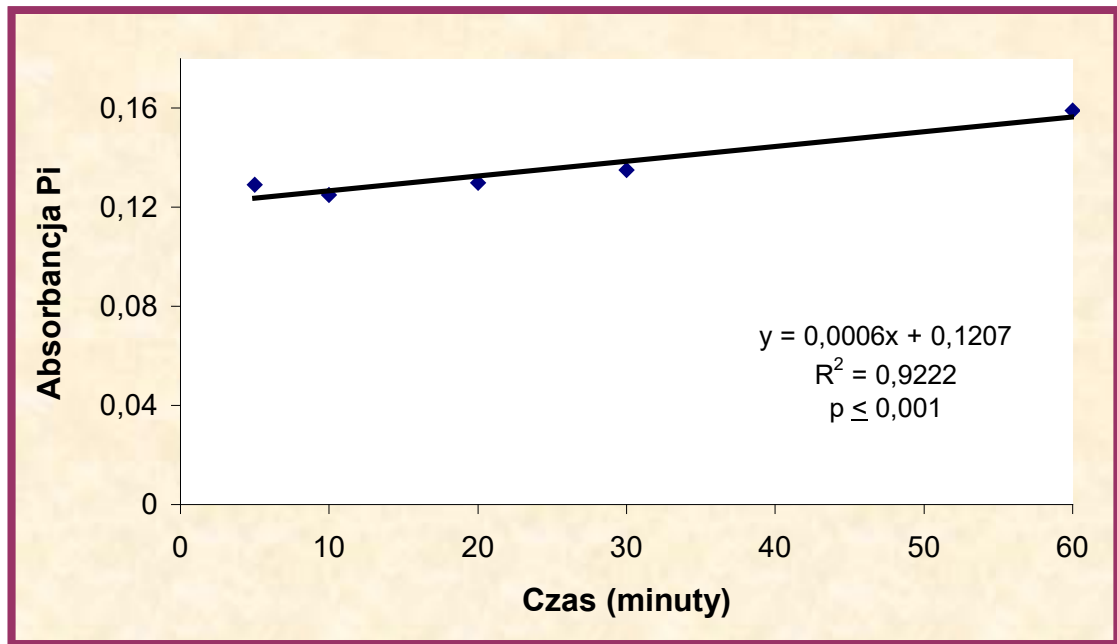
Tab. 9. Walidacyjne wskaźniki metody oznaczania fosforu nieorganicznego.

Granica oznaczalności	Granica liniowości	Powtarzalność metody	Odtwarzalność metody
25,0 µg/ml	200 µg/ml	9,9%	1,64%
(n = 5)	(n = 5)	(n = 20)	(n = 25)

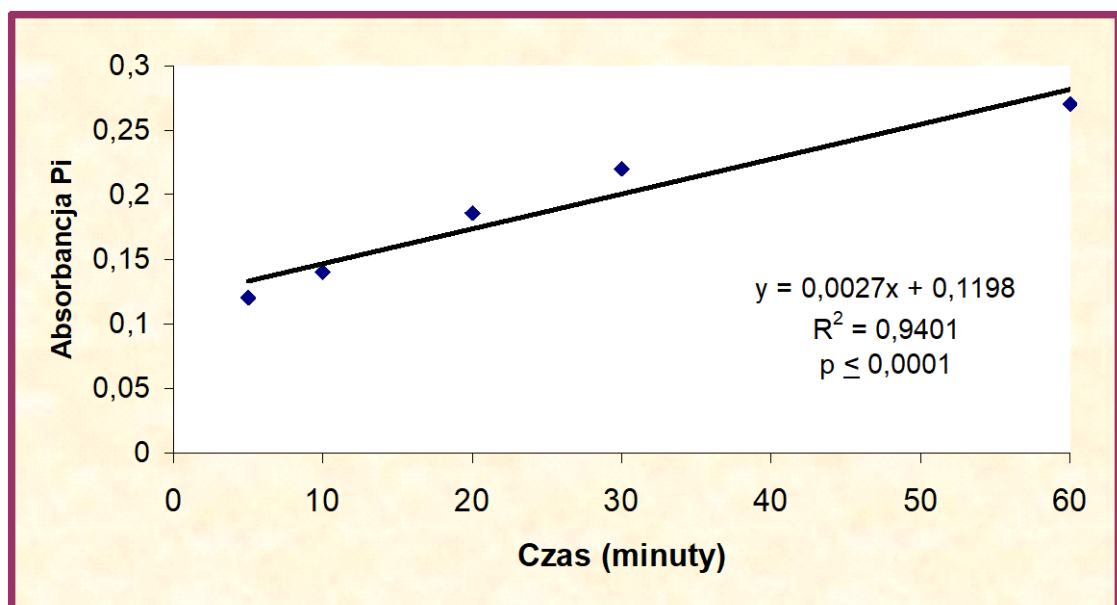
3.7.2 Wpływ odczynników odbiałczających na rozpad ATP

W celu optymalizacji warunków odbiałczania mieszaniny reakcyjnej zawierającej cienie erytrocytów oceniono wpływ roztworów PCA i TCA na spontaniczną hydrolizę ATP jako substratu enzymatycznego. Porównanie obu

kwasów przeprowadzono przy stężeniach odpowiednio 0,6 M i 60%. Jak wynika z własnych danych empirycznych umieszczonych na ryc. 4 i 5. PCA w czasie do 30 min. po dodaniu nie hydrolizował ATP, podczas gdy TCA wyraźnie hydrolizował substrat enzymatyczny. Dlatego do odbiałczania mieszaniny reakcyjnej podczas oznaczania aktywności ATPaz zastosowano 0,6 M PCA.



Ryc. 4. Wpływ 0,6 M PCA na spontaniczny rozpad ATP.



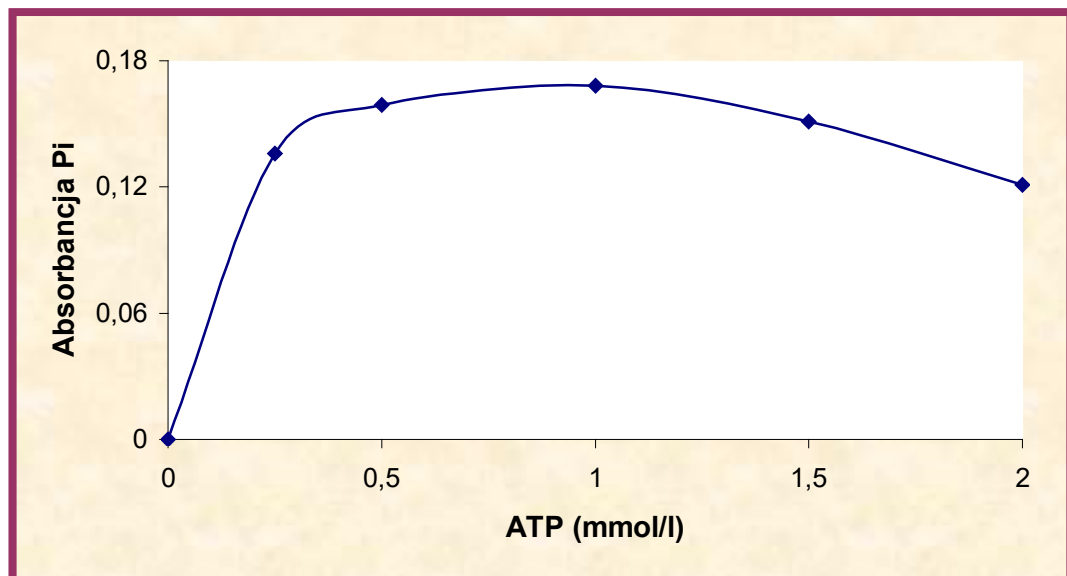
Ryc. 5. Wpływ 60% TCA na spontaniczny rozpad ATP.

3.7.3 Zależność aktywności enzymu od stężenia substratu

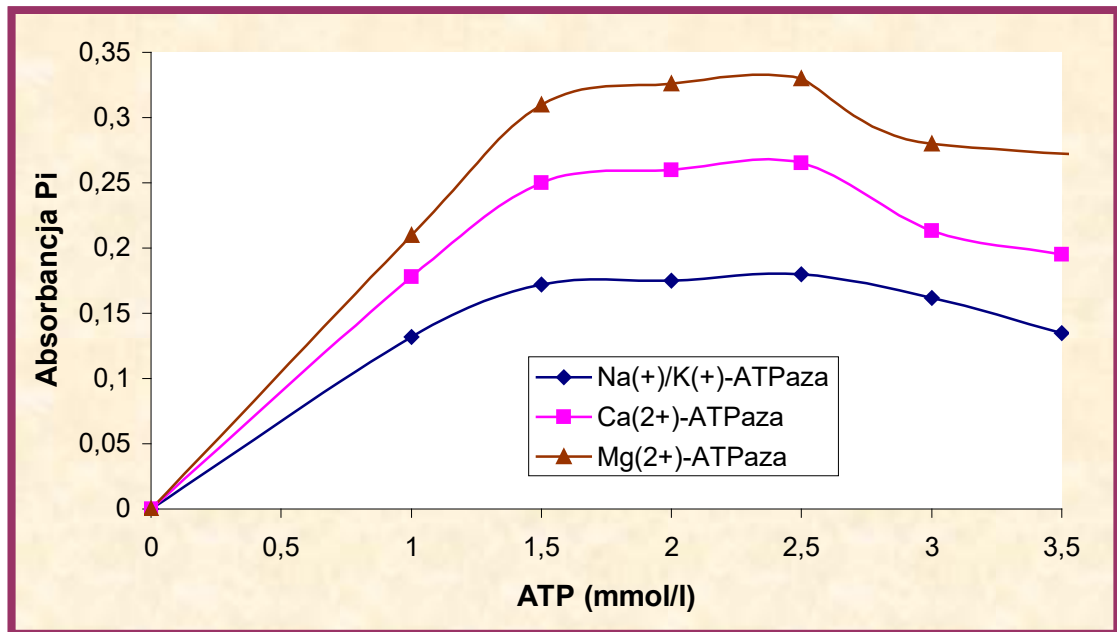
Oceniono wpływ różnych stężeń ATP na aktywność komercyjnej ATPazy oraz ATPazy w cieniach erytrocytów szczurzych i ludzkich. Stwierdzono, że w miarę wzrostu stężenia ATP, przy stałej ilości białka, rośnie aktywność ATPazy. Optymalne wyniki otrzymano przy stężeniach ATP wynoszących odpowiednio dla:

- ATPazy komercyjnej: 0,5 – 1,5 mmol/l (Ryc. 6)
- ATPazy w cieniach erytrocytów szczurzych: 1,5 – 2,5 mmol/l (Ryc. 7)
- ATPazy w cieniach erytrocytów ludzkich: 1,0 – 2,0 mmol/l (Ryc. 8)

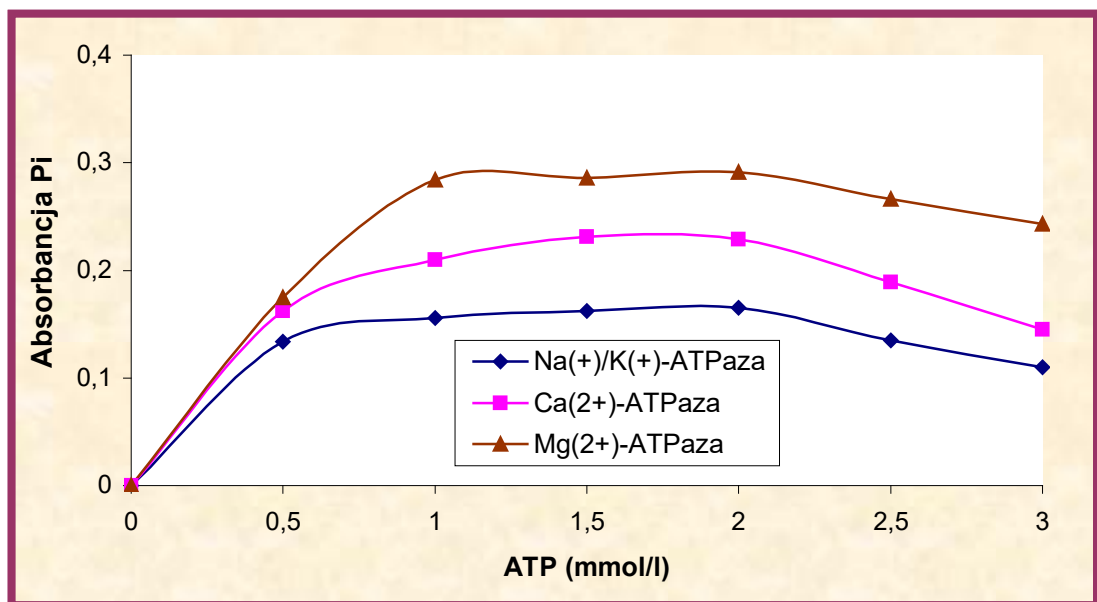
Wyższe stężenia ATP powodowały hamowanie aktywności ATPazy.



Ryc. 6. Wpływ różnych stężeń ATP na aktywność komercyjnej Na^+/K^+ -ATPazy. Każdy punkt stanowi średnią arytmetyczną z 3 niezależnych oznaczeń.



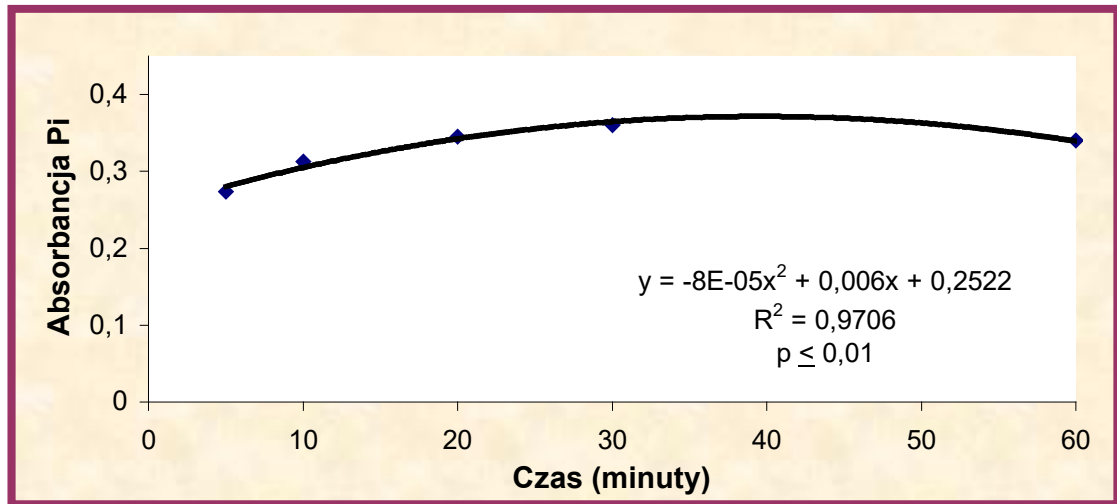
Ryc. 7. Wpływ różnych stężeń ATP na aktywność ATPaz z cieni erytrocytów szczurzych. Każdy punkt stanowi średnią arytmetyczną z 3 niezależnych oznaczeń.



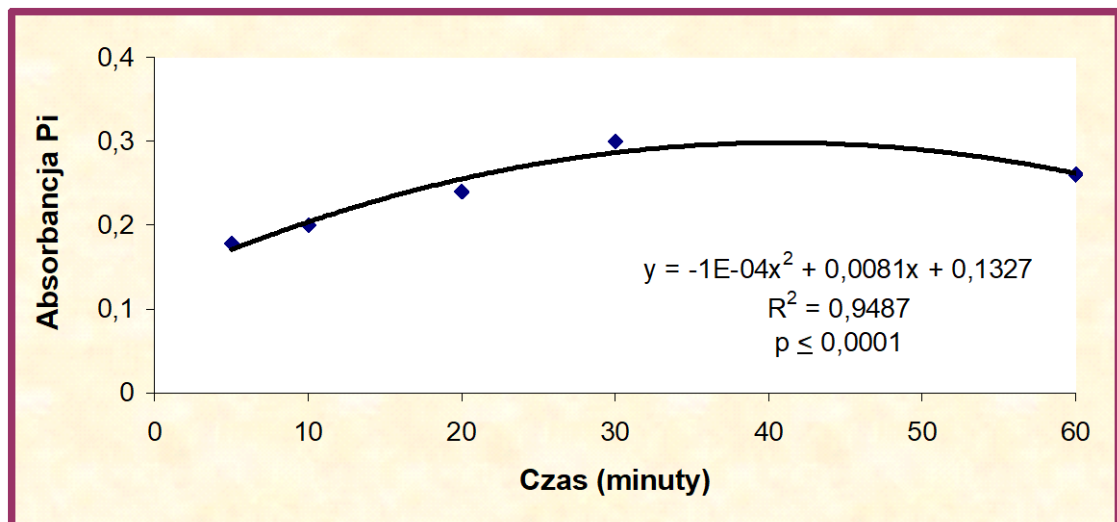
Ryc. 8. Wpływ różnych stężeń ATP na aktywność ATPaz z cieni erytrocytów ludzkich. Każdy punkt stanowi średnią arytmetyczną z 3 niezależnych oznaczeń.

3.7.4 Zależność aktywności enzymu od czasu inkubacji

W celu ustalenia optymalnego czasu inkubacji próbek zawierających ATPazy przeprowadzono badania w których wykazano, że 30 minut jest optymalnym czasem dla reakcji enzymatycznej (Ryc.9 i Ryc. 10).



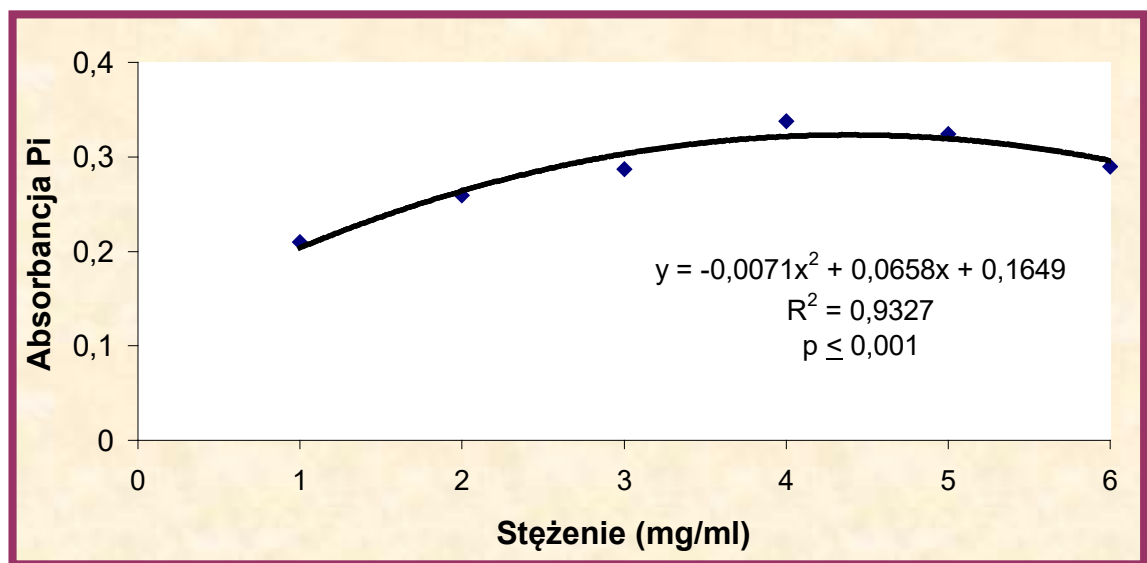
Ryc. 9. Wpływ czasu inkubacji na aktywność ATPazy w błonach erytrocytów szczurzych. Każdy punkt stanowi średnią arytmetyczną z 3 niezależnych oznaczeń.



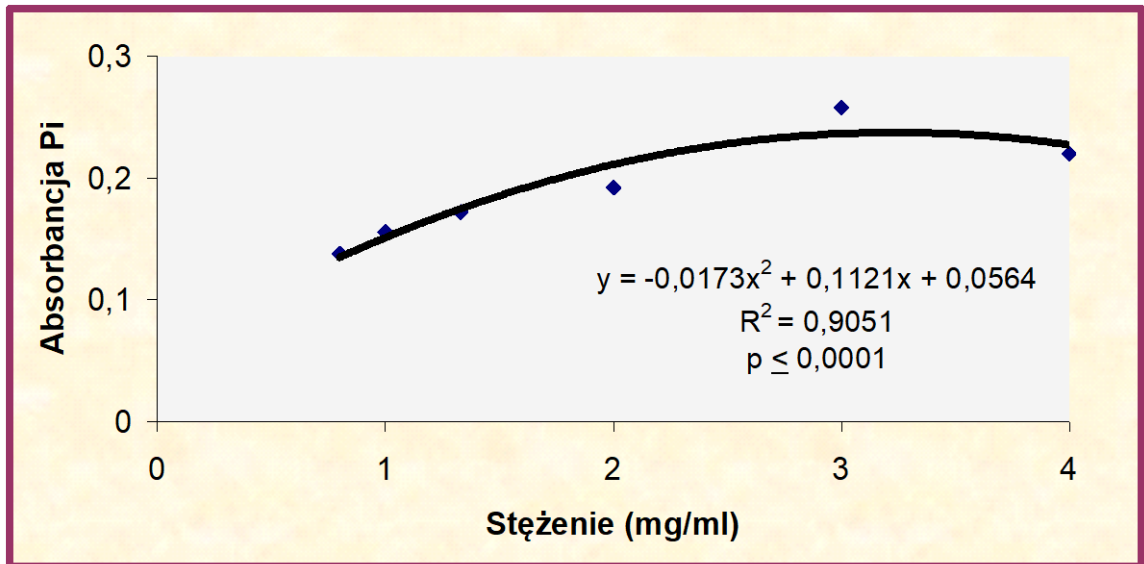
Ryc. 10. Wpływ czasu inkubacji na aktywność ATPazy w błonach erytrocytów ludzkich. Każdy punkt stanowi średnią arytmetyczną z 3 niezależnych oznaczeń.

3.7.5 Wpływ stężenia białka cieni erytrocytarnych na aktywność ATPaz

Zbadano wpływ różnych stężeń białka cieni erytrocytów ludzkich i szczurzych na aktywność ATPaz. Wyniki przedstawiono na ryc. 11 i ryc. 12. Za optymalne stężenie białka w szczurzych cieniach erytrocytarnych przyjęto 4 mg/ml, natomiast w ludzkich cieniach erytrocytarnych 3,5 mg/ml.



Ryc. 11. Wpływ stężenia białka cieni erytrocytów szczurzych na aktywność ATPazy. Każdy punkt stanowi średnią arytmetyczną z 3 niezależnych oznaczeń.



Ryc. 12. Wpływ stężenia białka cieni erytrocytów ludzkich na aktywność ATPazy. Każdy punkt stanowi średnią arytmetyczną z 3 niezależnych oznaczeń.

3.7.6 Wpływ kwasów alkoksyoctowych na Na^+/K^+ -ATPazę komercyjną oraz ATPazy w cieniach erytrocytów szczurzych i ludzkich ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazę, Na^+/K^+ -ATPazę oraz Ca^{2+} -ATPazę)

W celu wyznaczenia stałej inhibicji (K_i) oraz określenia typu hamowania posłużono się graficzną metodą Dixona (Zgirski i Gondko, 1998). Oznaczono szybkość reakcji enzymatycznej w obecności różnych stężeń AAA (V_i) (tab. 10) oraz bez ich obecności (V_o) dla 3 różnych stężeń ATP jako substratu jak w punkcie 3.6.3. Na podstawie tych oznaczeń wykreślono 3 krzywe zależności $1/V_i$ od stężenia inhibitora i wyznaczono wartość K_i z punktu przecięcia krzywych.

Tab. 10. Stężenia roztworów kwasów alkoksyoctowych zastosowane do wyznaczenia K_i metodą Dixona.

Kwas alkoksyoctowy	Stężenie (mmol/l)		
	ATPazy z cieni erytrocytów szczurzych	ATPazy z cieni erytrocytów ludzkich	ATPaza komercyjna
MAA	0 – 50,0	0 – 110,0	0 – 15,0
EAA	0 – 50,0	0 – 150,0	0 – 17,5
PAA	0 – 60,0	0 – 180,0	0 – 30,0
BAA	0 – 70,0	0 – 175,0	0 – 40,0
PEAA	0 – 80,0	0 – 185,0	0 – 50,0

4. Analiza statystyczna.

Wyniki zostały wyrażone jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (M \pm SD).

Wyniki badań hematologicznych *in vivo* analizowano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami jednego czynnika i oceną prostych efektów (MANOVA). Analizę przeprowadzono za pomocą programu statystycznego SPSS. Do porównania wyników w grupach narażonych na badany związek z grupami kontrolnymi, w każdym punkcie czasowym, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) po czym stosowano test Dunnetta.

Dla wyników badań hematologicznych erytrocytów szczurzych i ludzkich *in vitro* wyznaczono regresję kwadratową, dla której wyznaczono 95% przedziały ufności.

Ponadto, przeprowadzono analizę regresji liniowej i obliczono współczynniki korelacji Pearsona za pomocą programu komputerowego Statistica 6.0. Jako istotne statystycznie różnice porównywanych wielkości przyjęto $p \leq 0,05$.

5. Wyniki

5.1 Hemolityczne działanie EGAE u szczurów *in vivo*.

U szczurów otrzymujących ME w dawkach 2,5 – 5,0 mmol/kg nie obserwowano żadnych zmian hematologicznych. Natomiast po podaniu tego związku w dawce 10 mmol/kg wystąpił niewielki wzrost liczby retikulocytów w 6, 24 i 144 godz. doświadczenia.

Po podaniu EE zmiany hematologiczne ujawniły się tylko po najwyższej dawce tego związku tj. 10 mmol/kg (Ryc. 13, Ryc. 14). Zmiany te manifestowały się redukcją RBC, spadkiem Ht, HGB i MCHC oraz wzrostem MCV, Ret. i HGB_o. Zmiany liczby RBC, Ht, MCV, HGB, MCHC i HGB_o były najsilniej zaznaczone w pierwszej dobie doświadczenia, podczas gdy wzrost liczby Ret. był najwyższy w 6 dobie po podaniu EE. Stopień nasilenia tych zmian nie korelował z dawkami EE.

U szczurów, którym podano IPE w dawkach jednorazowych, działanie hemolityczne obserwowano na każdym poziomie dawkowania. Początkowo, tj. po 3 – 6 godzinach po podaniu tego związku, wystąpił wzrost Ht, MCV i stężenia HGB_o przy niewielkim spadku liczby RBC. W ciągu dalszych 24 godzin następowało masywne pęknięcie erytrocytów prowadzące do dramatycznej redukcji liczby tych komórek, spadku Ht, HGB i MCHC oraz wzrostu HGB_o i liczby retikulocytów (Ryc. 15, Ryc. 16).

Spadki RBC, Ht, HGB i MCHC w 24 godz. doświadczenia korelowały ujemnie z dawkami IPE (korelacja liniowa). Natomiast wzrost MCV w 6 godz. doświadczenia, Ret. w 144 godz. korelowały dodatnio z dawkami IPE (korelacja liniowa). Ponadto, wzrost stężenia HGB_o w 6 godz. doświadczenia korelował nieliniowo z dawkami tego związku (Ryc. 17, Ryc. 18).

Na podstawie równań regresji dla zależności dawka-efekt dla RBC, Ht, MCV i HGB obliczono efektywne dawki IPE powodujące wzrost lub spadek

wyjściowych wartości badanych wskaźników hematologicznych o 50% (ED_{50}). Wartości te wynosiły odpowiednio 1,94, 2,36, 1,82, 1,79 mmol/kg.

Podobne zmiany hematologiczne jak w przypadku IPE, ale silniej zaznaczone i utrzymujące się na ogół do końca doświadczenia, obserwowano po podaniu BE. Największa dawka tego związku (5 mmol/kg) była przyczyną wyżej opisanych zmian hematologicznych utrzymujących się przez 6 dni obserwacji. Ponadto, w 6 i 24 godz. doświadczenia wystąpił wzrost MCH (Ryc. 19, Ryc. 20).

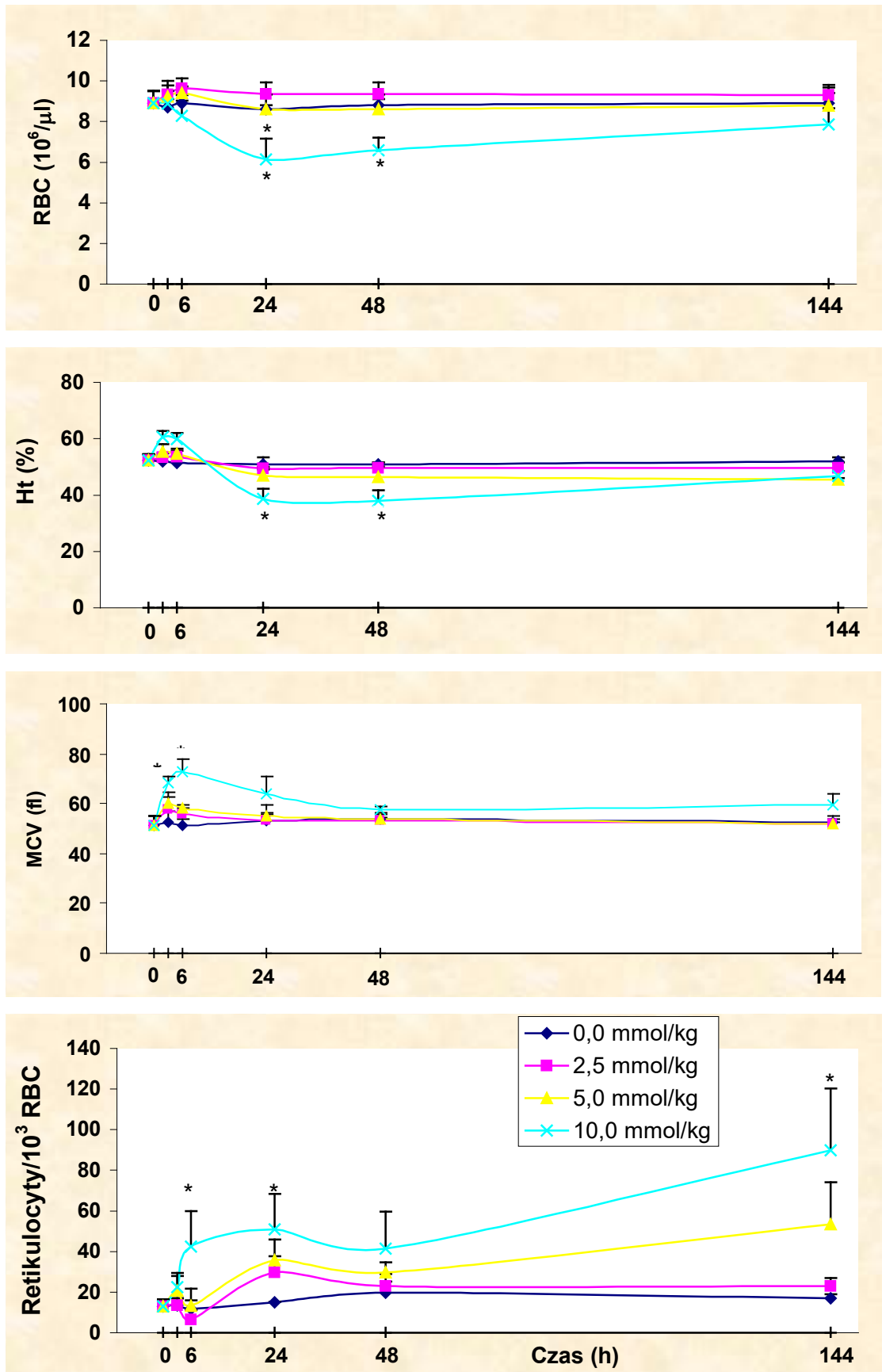
W wyniku masywnej hemolizy erytrocytów nie było możliwe oznaczenie liczby retikulocytów w 3 i 6 godzinie po podaniu BE (Ryc. 19).

Redukcja liczby RBC, spadek Ht oraz MCHC w 24 godz. doświadczenia ujemnie korelowały z dawkami BE (korelacja nieliniowa). Z drugiej strony wzrost wartości MCV, MCH i liczby Ret. w 24 godz. doświadczenia korelowały dodatnio z dawkami BE (w przypadku Ret. korelacja nieliniowa) (Ryc. 21, Ryc. 22).

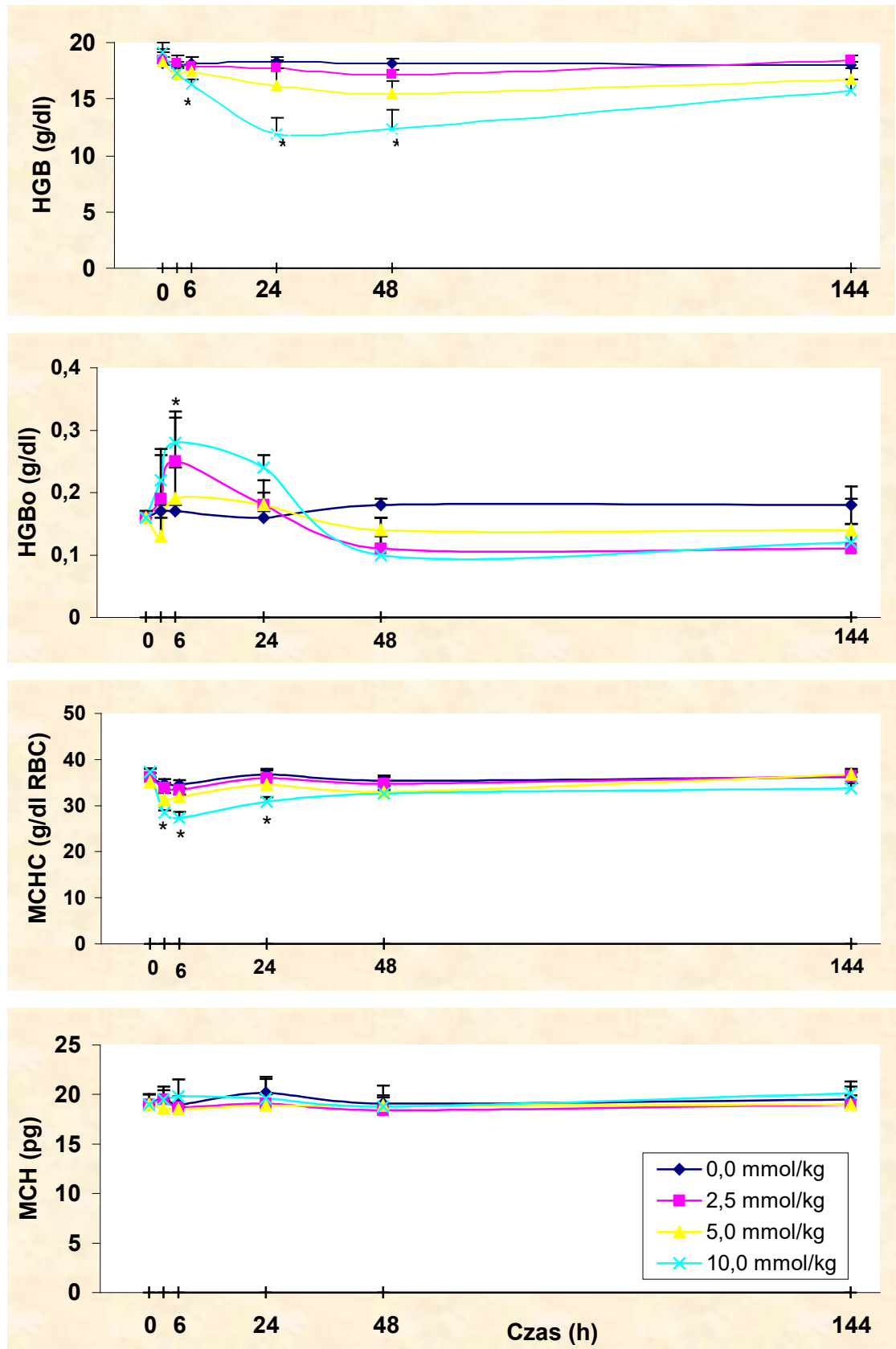
Wartości ED_{50} dla BE obliczone z równań regresji dla zależności dawka-efekt w przypadku RBC, Ht, MCV i HGB wynosiły odpowiednio 1,53, 1,98, 1,44, 1,87 mmol/kg.

Ponadto, u szczurów otrzymujących BE w dawkach 0,625 – 5,0 mmol/kg wystąpiła hemoglobinuria, której nasilenie w pierwszej dobie po podaniu tego związku wykazywało liniową korelację z jego dawkami (Ryc. 23).

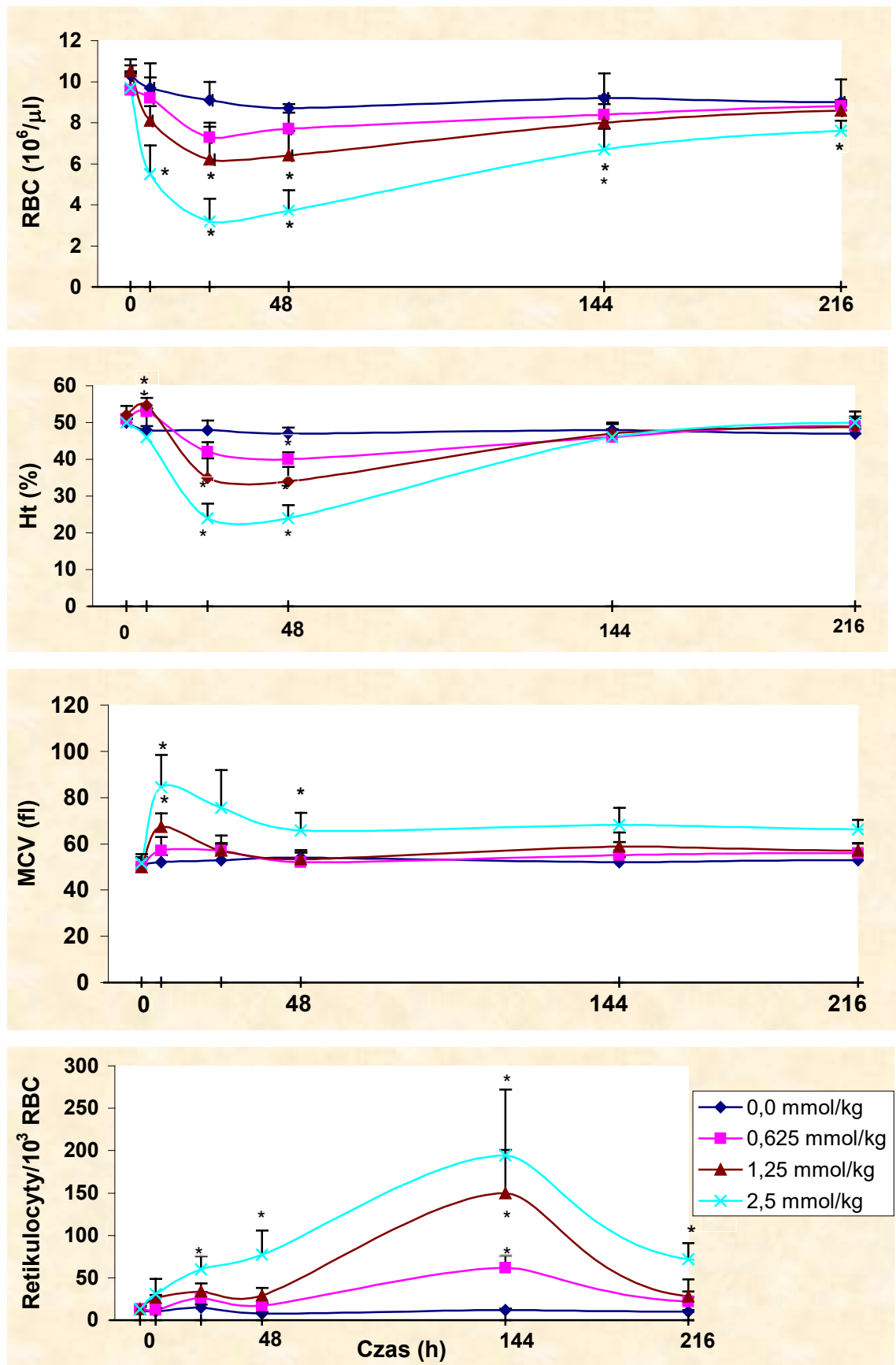
Zmiany hematologiczne obserwowane po podaniu IPE lub BE zależały od dawki ksenobiotyku oraz czasu trwania obserwacji.



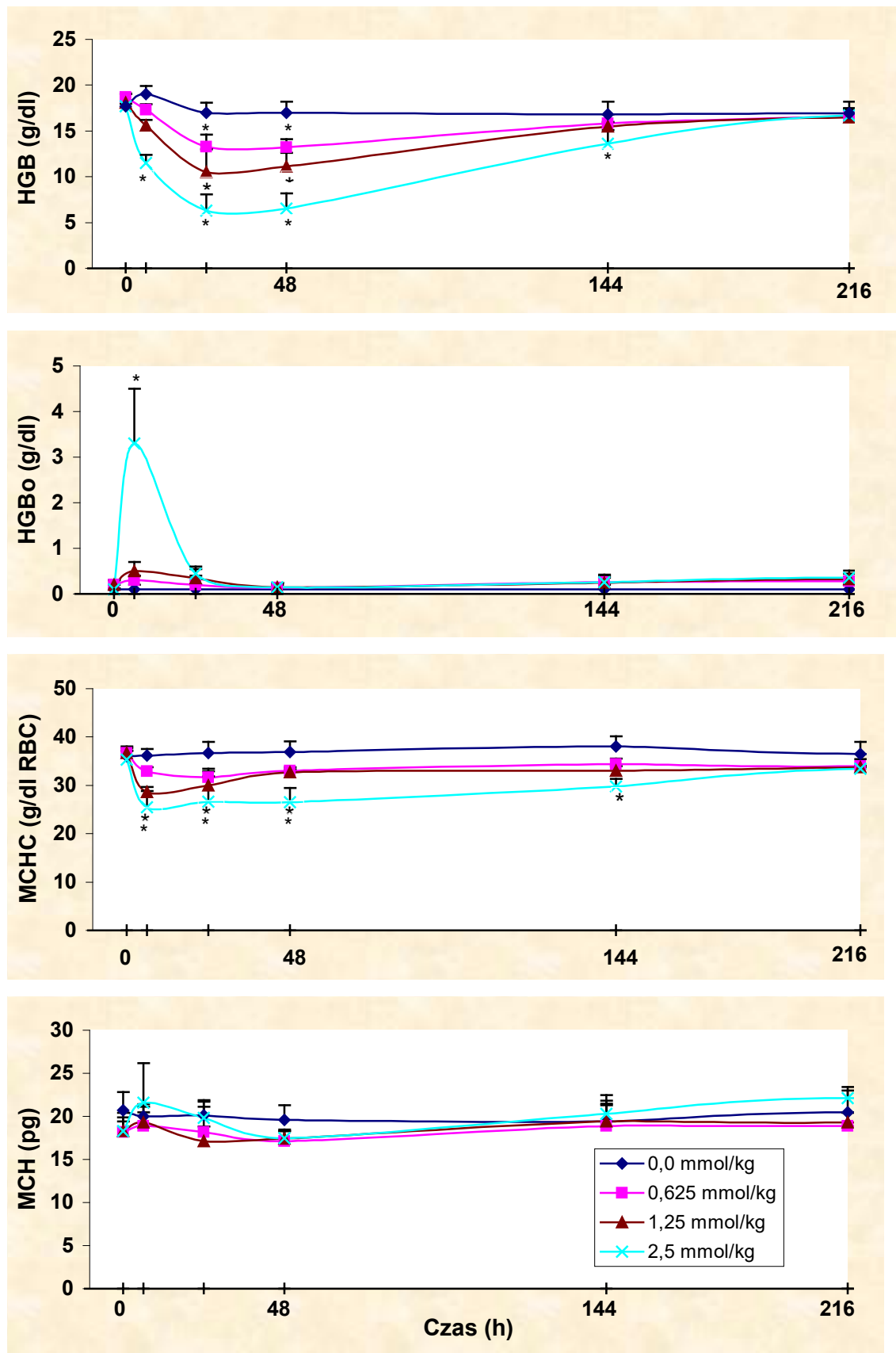
Ryc. 13. Zmiany liczby RBC, Ht, MCV i Ret. we krwi obwodowej szczurów po jednorazowym, podskórnym podaniu EE w dawkach 2,5 – 10,0 mmol/kg. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$. * $p < 0,001$



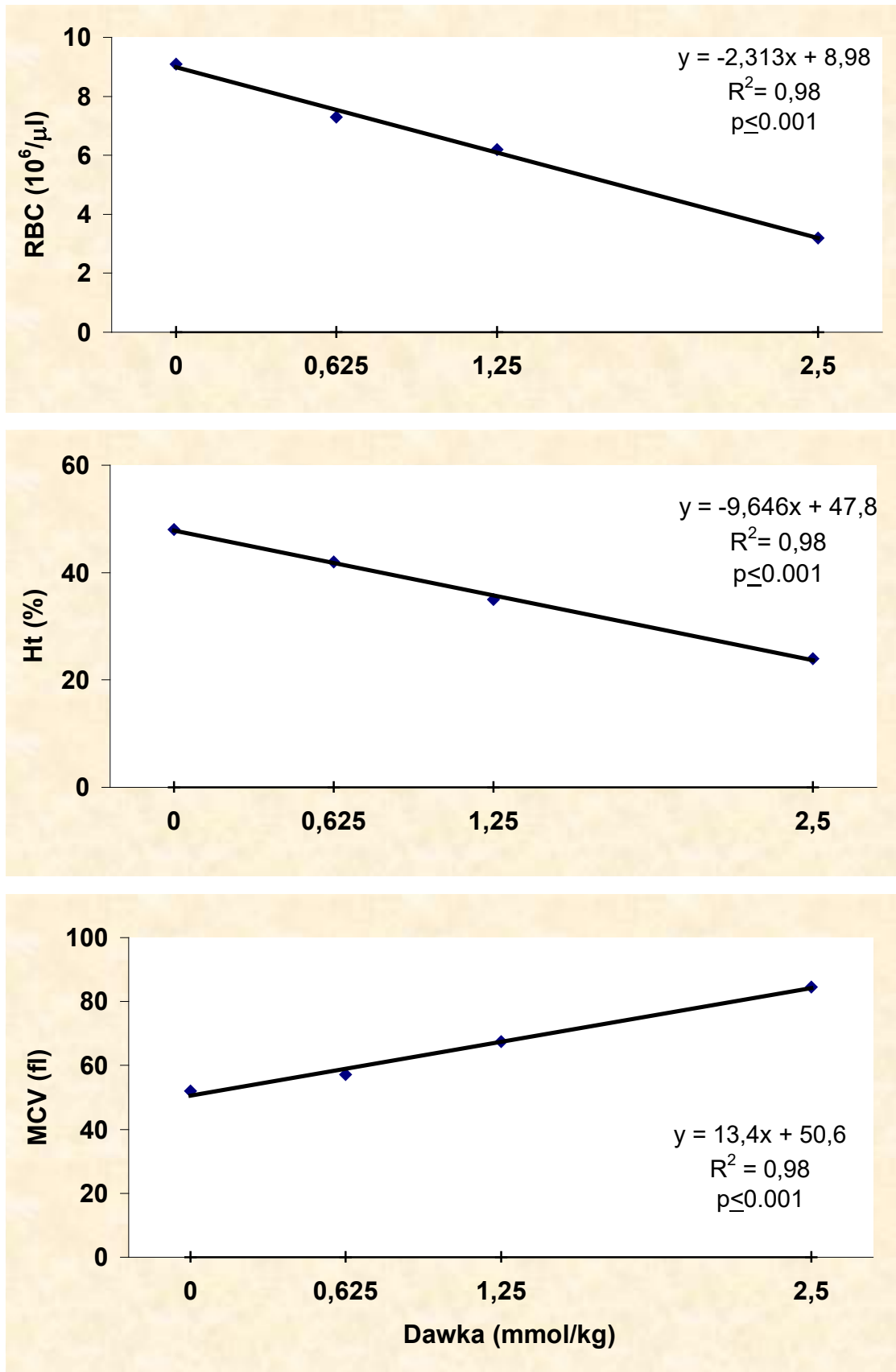
Ryc. 14. Zmiany stężenia HGB całkowitej i osoczowej (HGB₀) oraz MCHC i MCH we krwi obwodowej szczurów po jednorazowym, podskórnym podaniu EE w dawkach 2,5 – 10,0 mmol/kg. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$. * $p < 0,001$.



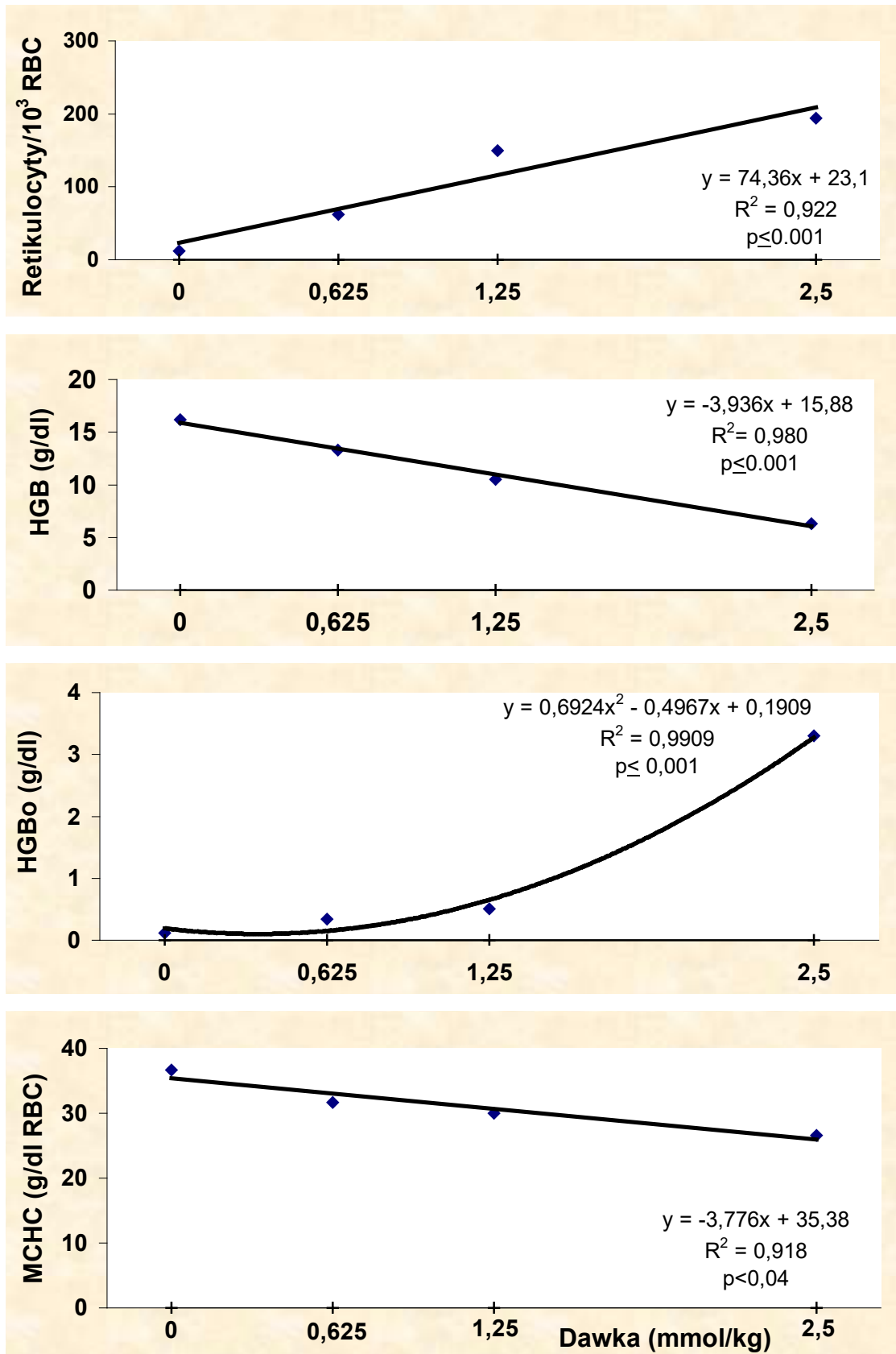
Ryc. 15. Zmiany liczby RBC, Ht, MCV i Ret. we krwi obwodowej szczurów po jednorazowym, podskórnym podaniu IPE w dawkach 0,625 – 2,5 mmol/kg. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$. * $p < 0,001$



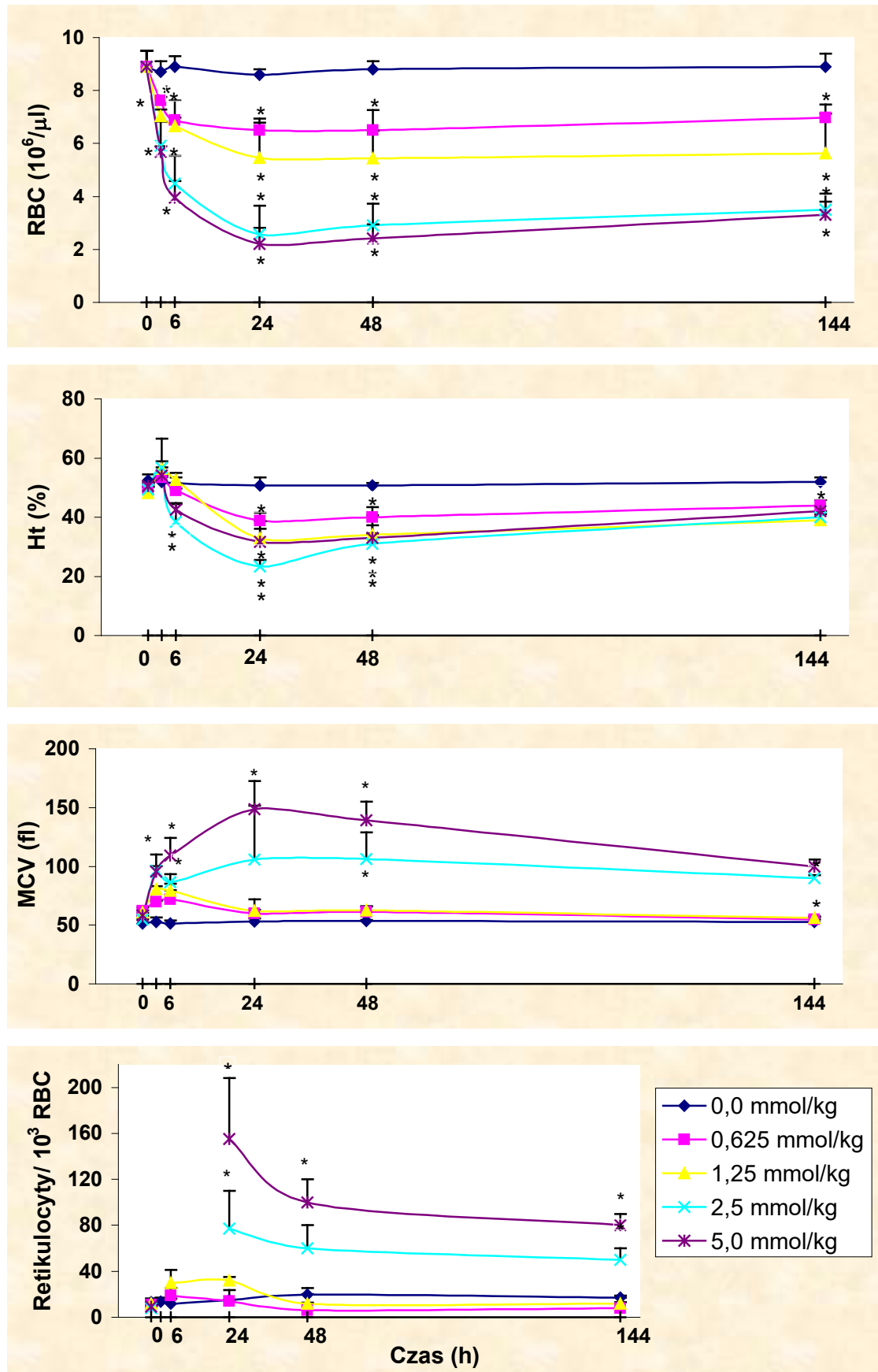
Ryc. 16. Zmiany stężenia HGB całkowitej i osoczowej (HGB₀), MCHC oraz MCH we krwi obwodowej szczurów po jednorazowym, podskórnym podaniu IPE w dawkach 0,625 – 2,5 mmol/kg. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$. * $p < 0,001$.



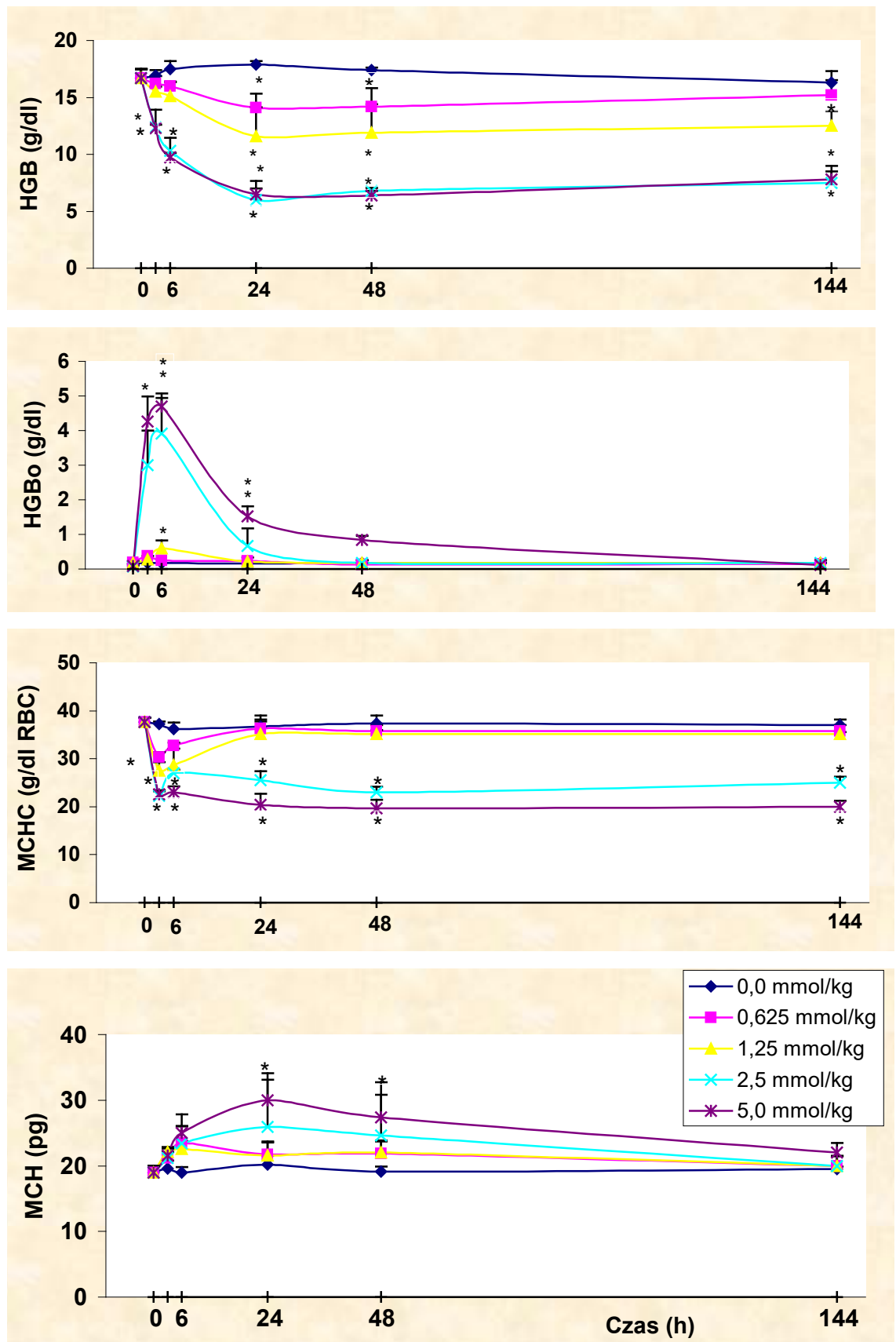
Ryc. 17. Zależność dawka - efekt dla RBC i Ht (24 h) oraz MCV (6 h) u szczurów otrzymujących podskórną IPE w dawkach 0-2,5 mmol/kg.



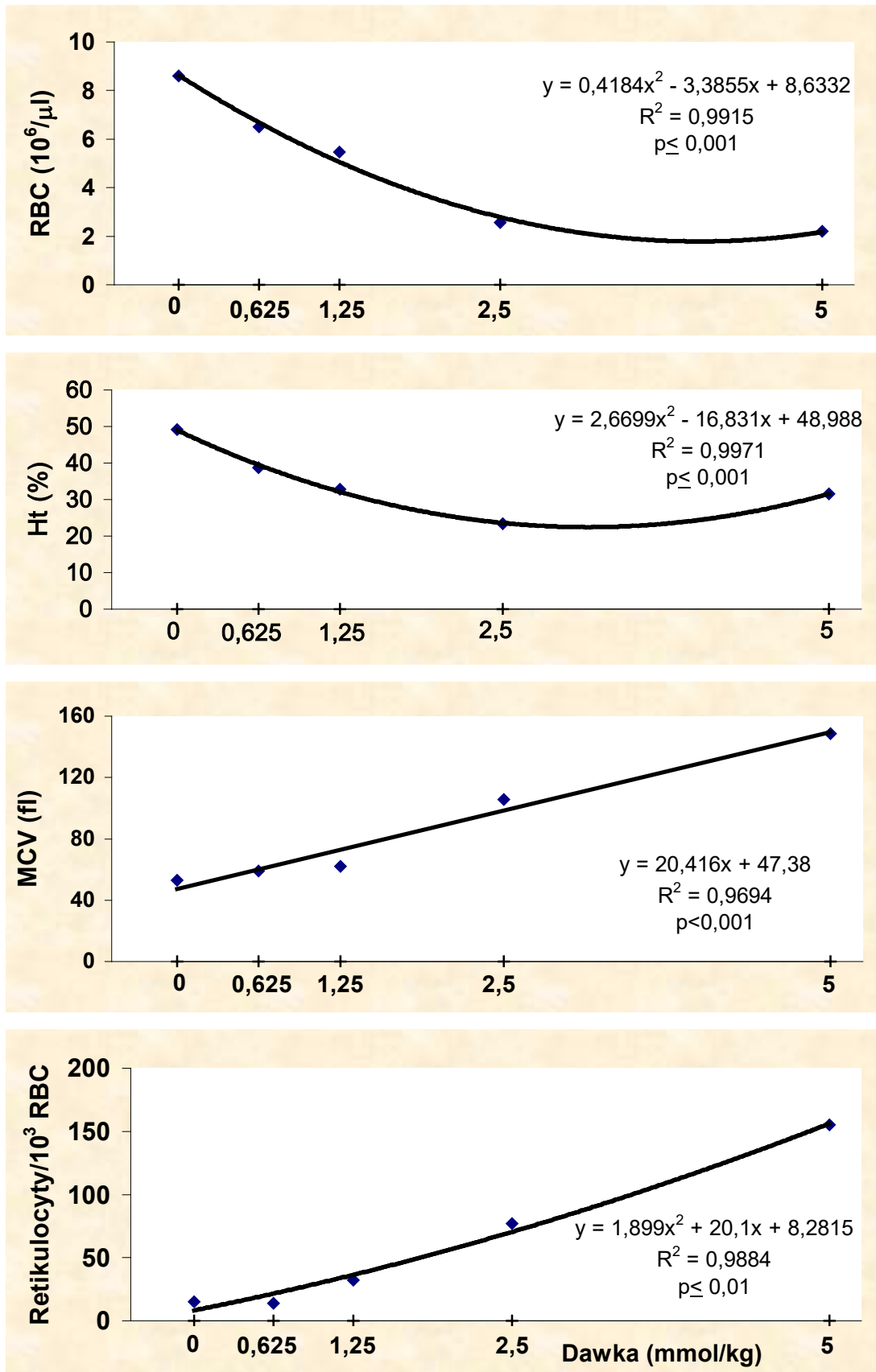
Ryc. 18. Zależność dawka - efekt dla Ret. (144 h), stężenia HGB całkowitej (24 h) i osoczowej (HGB_o) (6 h) oraz MCHC (24 h) u szczurów otrzymujących podskórnie IPE w jednorazowych dawkach 0 – 2,5 mmol/kg.



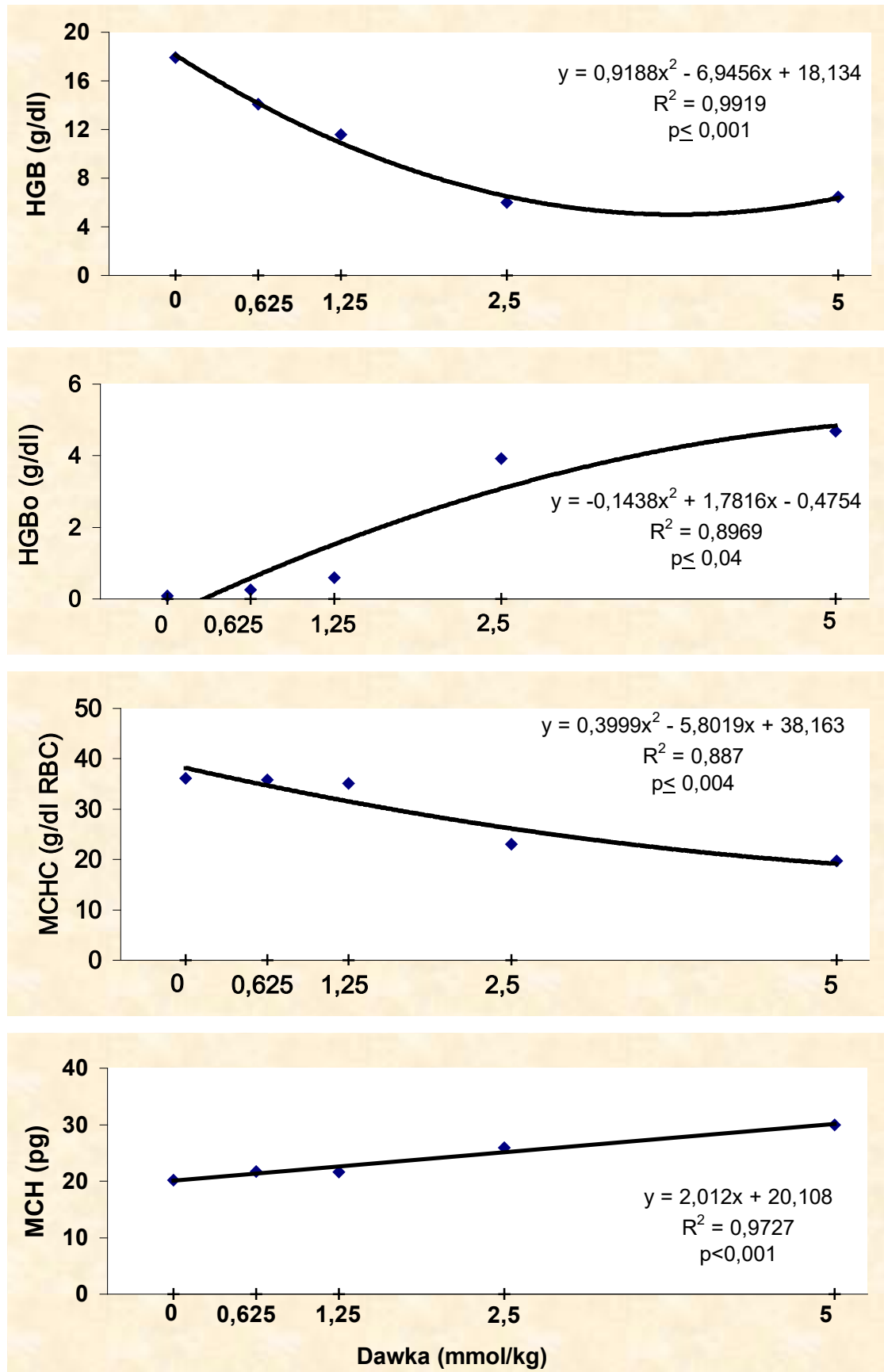
Ryc. 19. Zmiany liczby RBC, Ht, MCV i Ret. we krwi obwodowej szczurów po jednorazowym, podskórnym podaniu BE w dawkach 0,625 – 5,0 mmol/kg. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$. * $p < 0,001$.



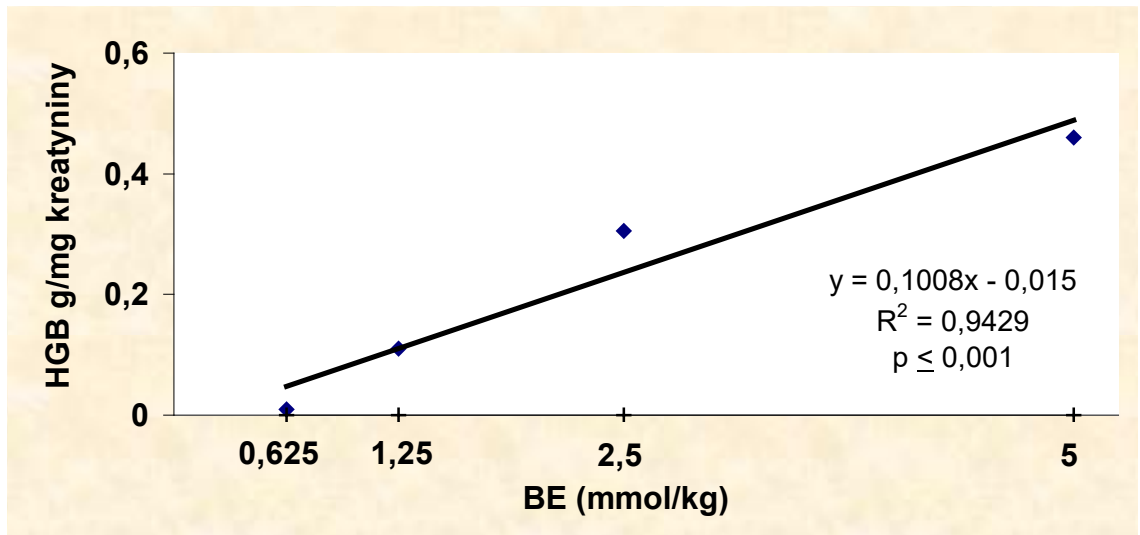
Ryc. 20. Zmiany stężenia HGB całkowitej i osoczowej (HGB₀), MCHC oraz MCH we krwi obwodowej szczurów po jednorazowym, podskórnym podaniu BE w dawkach 0,625 – 5,0 mmol/kg. Wartości wyrażono jako $M \pm SD$. * $p < 0,001$.



Ryc. 21. Zależność dawka - efekt dla RBC, Ht, MCV i Ret. (24 h) u szczurów otrzymujących podskórną BE w dawkach jednorazowych 0 – 5 mmol/kg.



Ryc. 22. Zależność dawka - efekt dla (24 h), HGB (24 h) i HGB₀ (6 h) oraz dla MCHC i MCH (24 h) u szczurów otrzymujących podskórnie BE w jednorazowych dawkach 0 – 5 mmol/kg.



Ryc. 23. Zależność dawka - efekt dla zmian stężenia HGB w dobowym moczu szczurów otrzymujących podskórną BE w dawkach 0,625 – 5,0 mmol/kg.

5.2 Etanol, metylopirazol i pirazol jako swoiste odtrutki w ostrym zatruciu EGAE

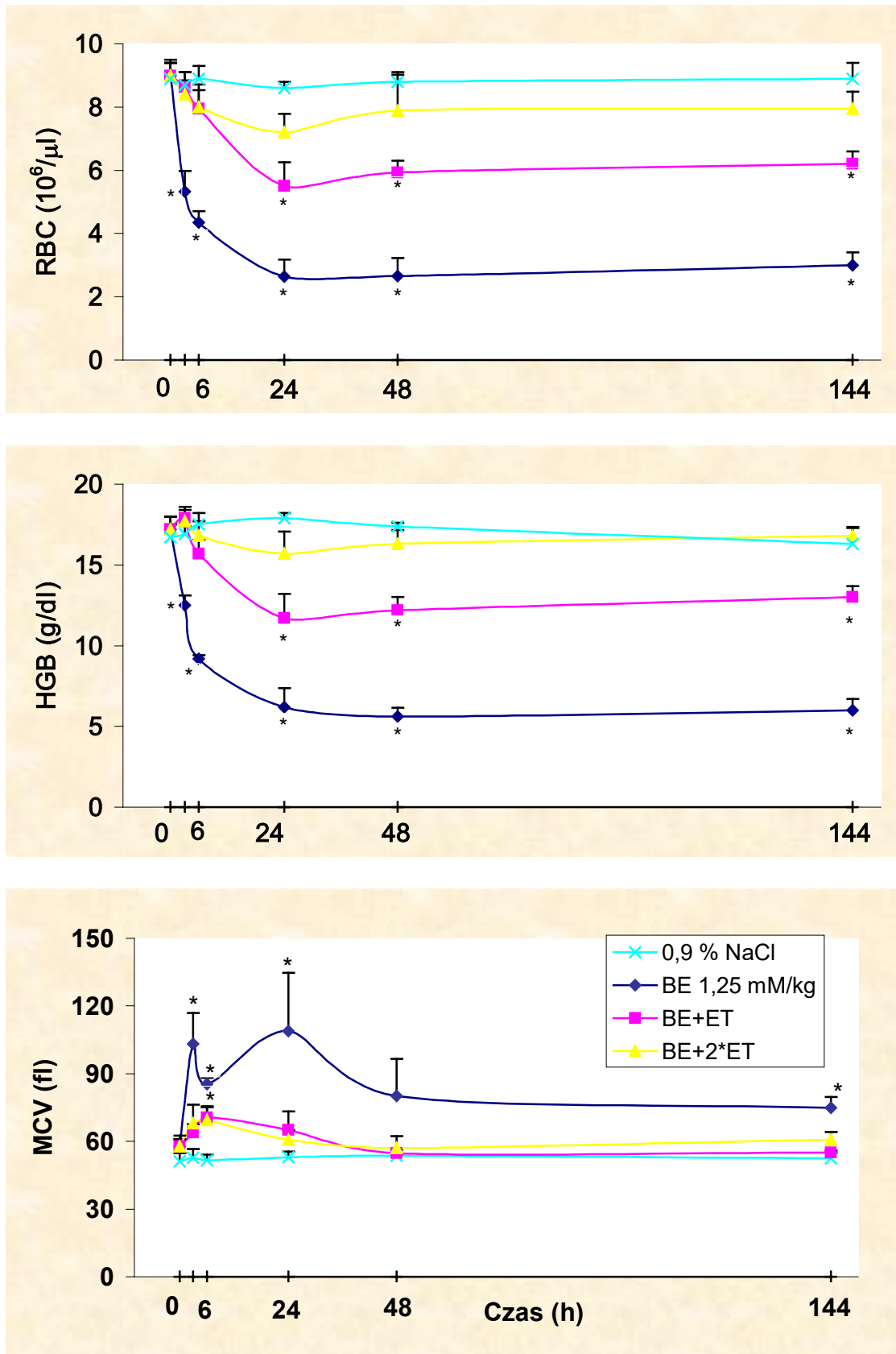
Dwukrotne podanie etanolu drogą dożołądkową 15 min. przed i 3 godz. po wstrzyknięciu BE w dawce 1,25 mmol/kg, całkowicie chroniło szczury przed wystąpieniem wewnątrznaczyniowej hemolizy manifestującej się redukcją RBC, spadkiem stężenia HGB oraz wzrostem MCV. Natomiast jednorazowe podanie etanolu 15 min. przed podskórnym wstrzyknięciem BE tylko częściowo chroniło erytrocyty przed hemolizą (Ryc. 24).

Również MP podawany w dawkach jednorazowych 0,18 lub 0,36 mmol/kg całkowicie znosił hemolityczne działanie badanego eteru, natomiast w dawce 0,045 mmol/kg tylko częściowo chronił erytrocyty przed hemolizą (Ryc. 25).

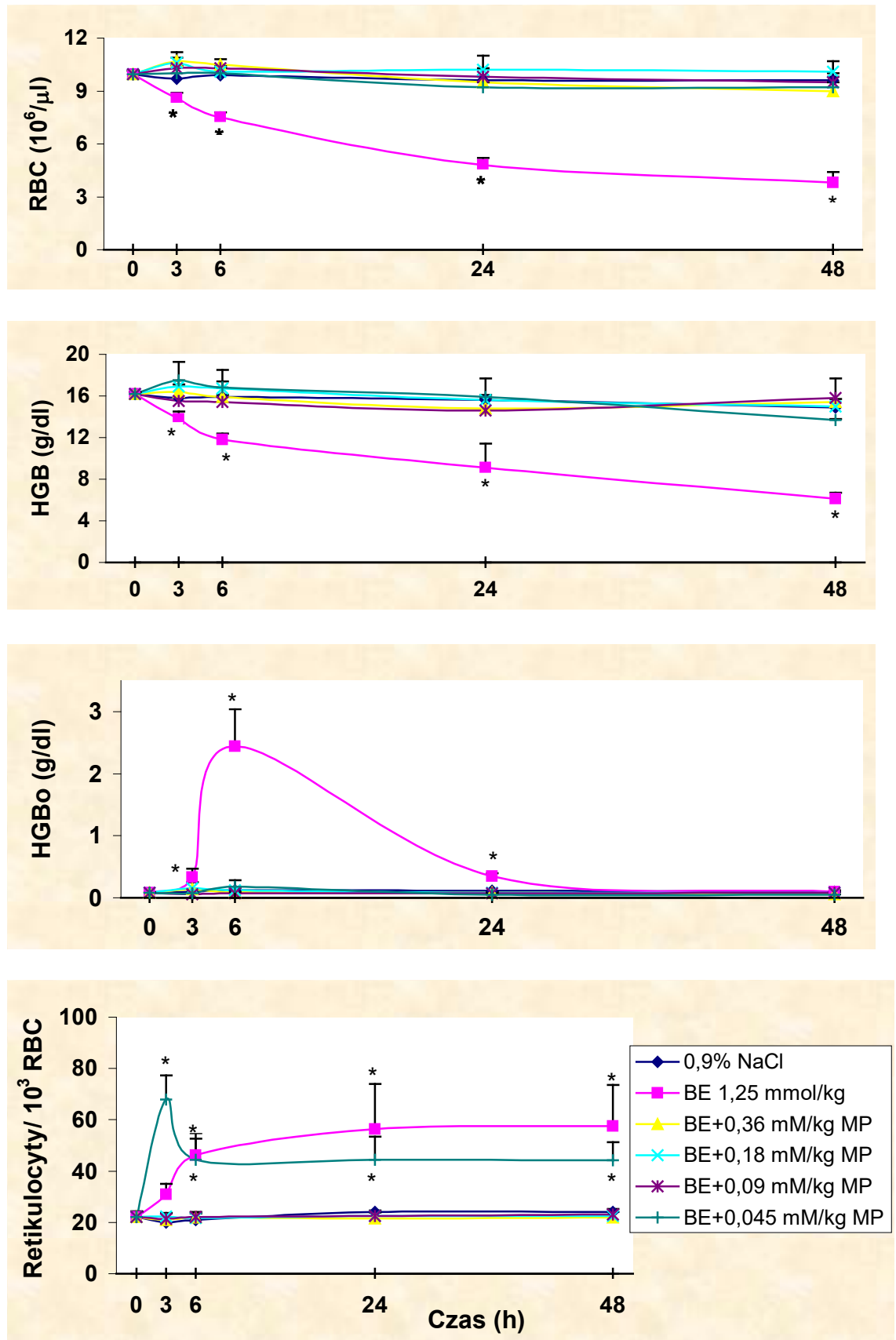
MP podany szczurom 2 lub 5 godz. po wstrzyknięciu BE praktycznie nie działał ochronnie (Ryc. 26).

Ponadto, PY w dawkach (0,09 – 0,36 mmol/kg) podawany bezpośrednio przed wstrzyknięciem BE przeciwdziałał hemolizie indukowanej przez ten związek (Ryc. 27).

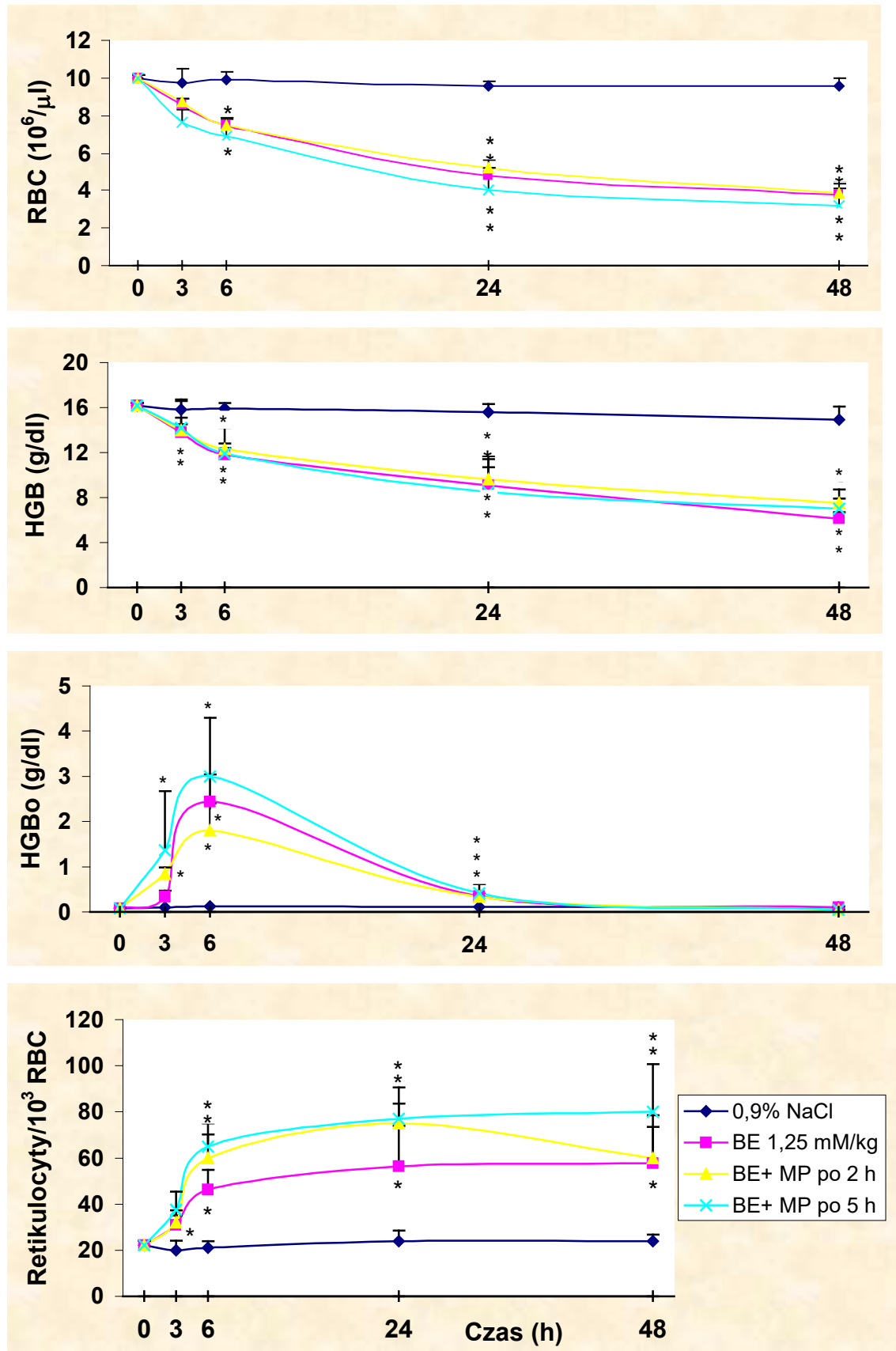
Podanie PY szczurom po 2 lub 5 godz. po wstrzyknięciu BE nie przeciwdziałało wystąpieniu wewnątrznaczyniowej hemolizy (Ryc. 28).



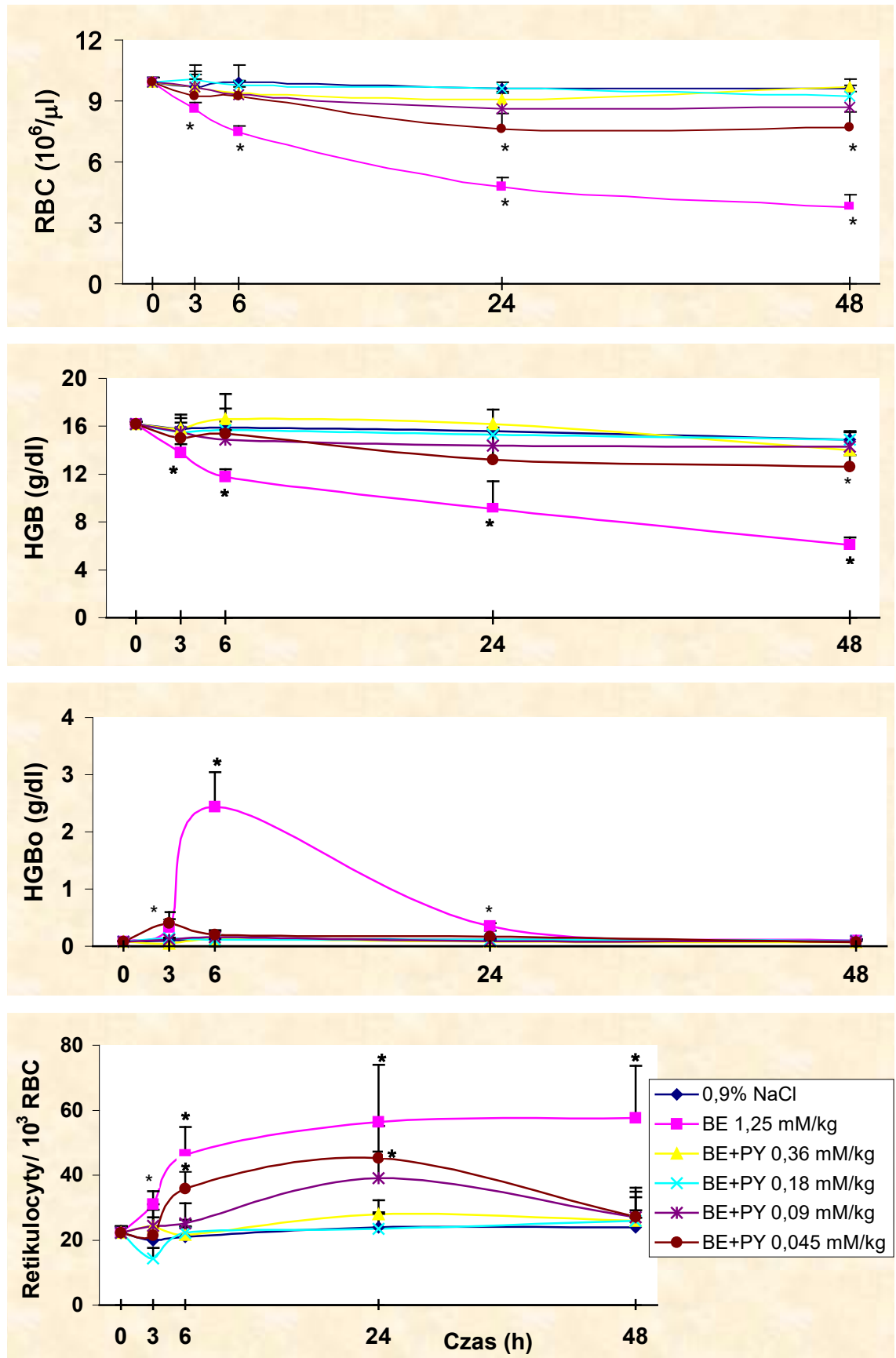
Ryc. 24. Czasowe zmiany RBC, HGB i MCV we krwi obwodowej szczurów otrzymujących podskórnie BE w dawce 1,25 mmol/kg oraz jedną dawkę lub dwie dawki etanolu obok BE.
* $p < 0,001$.



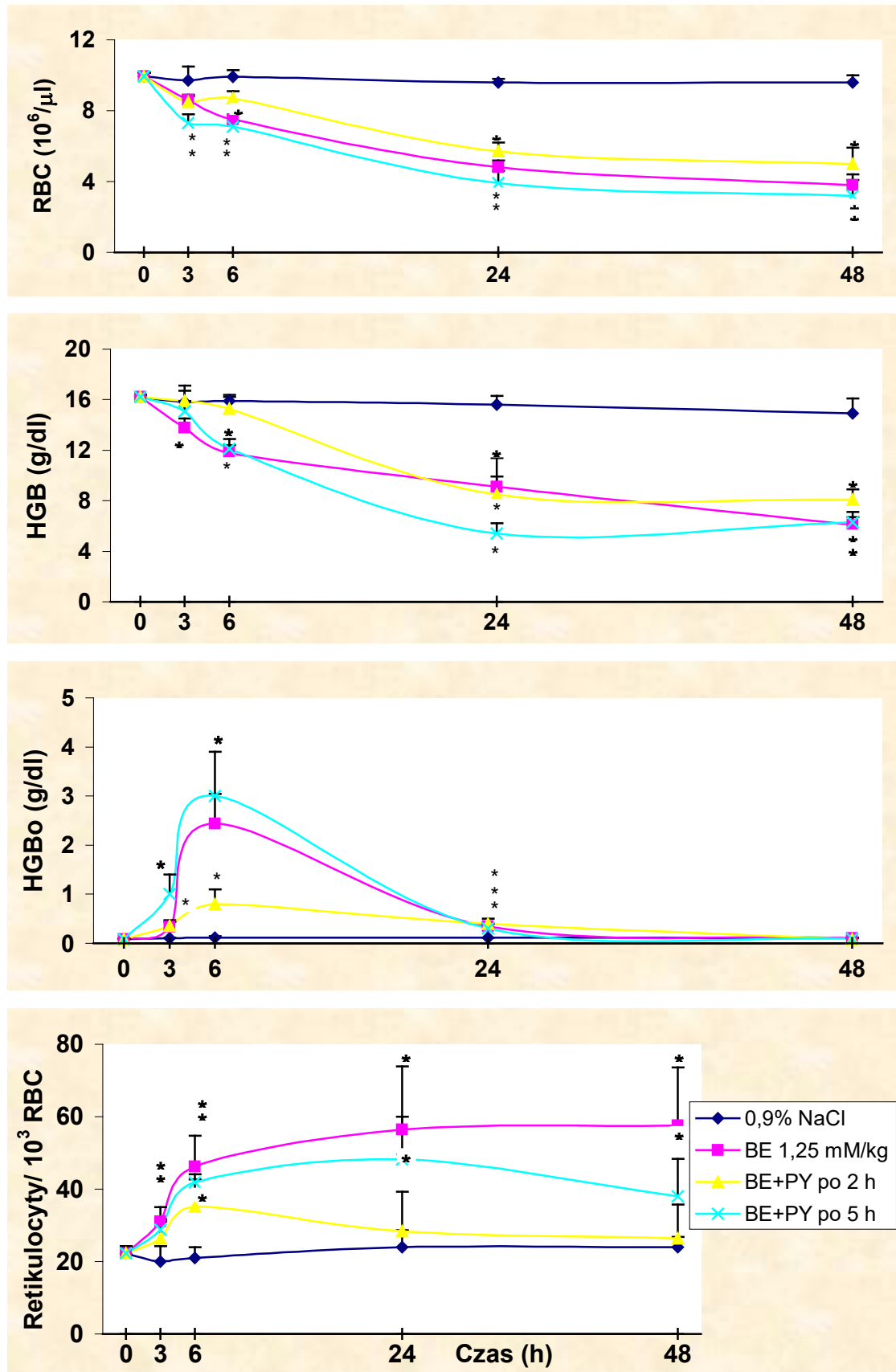
Ryc. 25. Czasowe zmiany RBC, HGB całkowitej i osoczowej oraz Ret. we krwi obwodowej szczurów otrzymujących podskórnie BE w dawce 1,25 mmol/kg lub metylopirazol w różnych dawkach obok BE. * $p < 0,001$.



Ryc. 26. Czasowe zmiany RBC i Ret. we krwi obwodowej szczurów otrzymujących podskórnie tylko BE w dawce 1,25 mmol/kg lub MP po 2 lub 5 godz. po podaniu BE.
* $p < 0,001$.



Ryc. 27. Czasowe zmiany RBC, HGB całkowitej i osoczowej oraz Ret. we krwi obwodowej szczurów otrzymujących podskórnie BE w dawce 1,25 mmol/kg oraz BE lub różne dawki pirazolu obok BE. * $p < 0,001$.



Ryc. 28. Czasowe zmiany RBC, HGB całkowitej i osoczowej oraz Ret. we krwi obwodowej szczurów otrzymujących podskórnie sam BE w dawce 1,25 mmol/kg lub PY po 2 lub 5 godz. po podaniu BE.
* $p < 0,001$

5.3 Hemolityczne działanie kwasów alkoksylowych na erytrocyty szczura i człowieka *in vitro*

Porównano działanie hemolityczne pięciu kwasów alkoksylowych (AAA), będących metabolitami EGAE, na erytrocyty szczura i człowieka *in vitro*. Wszystkie AAA powodowały spadek liczby RBC i Ht oraz wzrost MCV. Zmiany te zależały od rodzaju kwasu, jego stężenia oraz czasu trwania inkubacji.

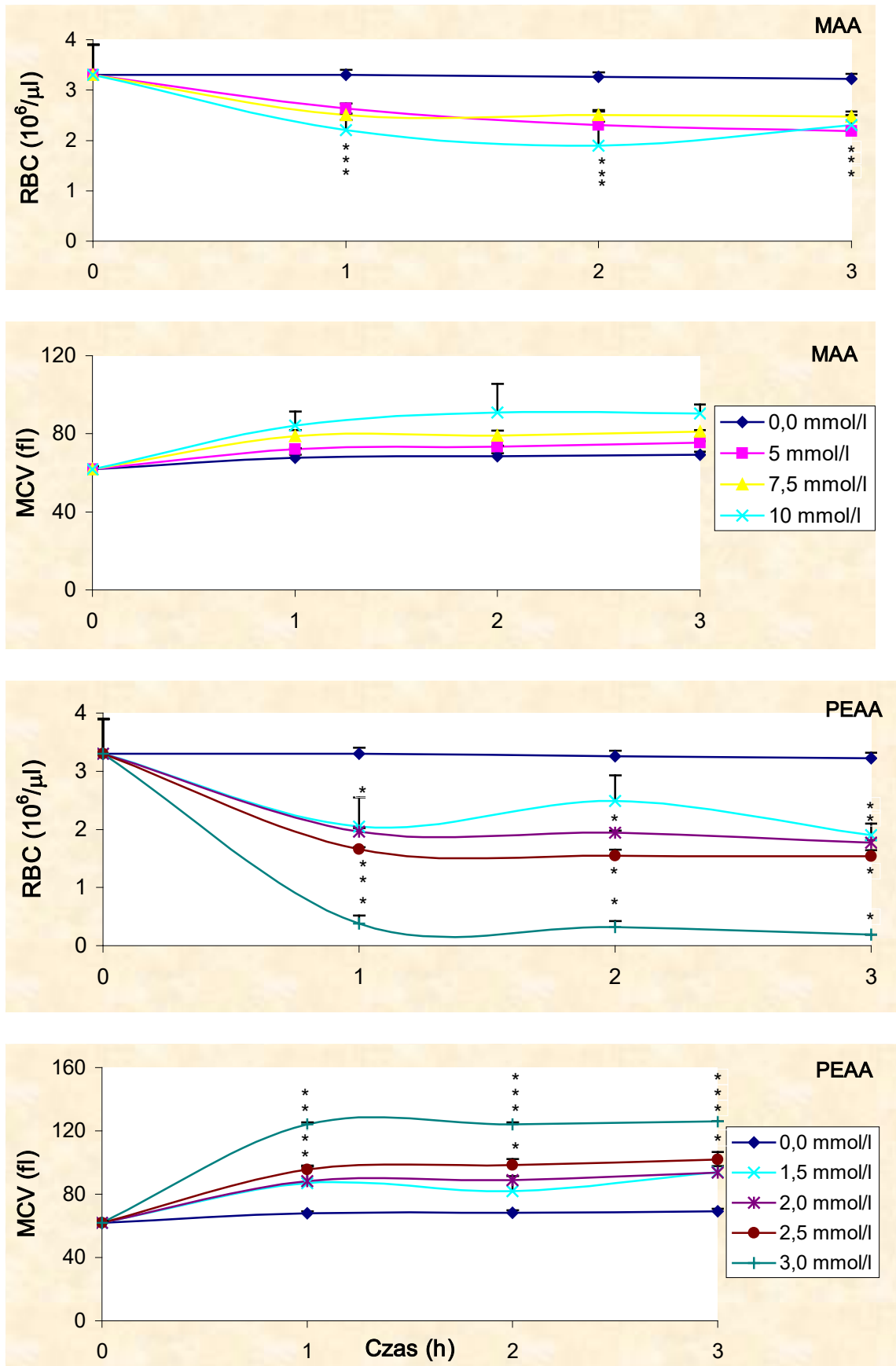
Erytrocyty szczura były bardziej podatne na hemolityczne działanie AAA niż erytrocyty człowieka. Dla przejrzystości materiału ilustracyjnego zmiany wskaźników hematologicznych w funkcji czasu przedstawiono tylko na przykładzie MAA i PEAA z uwzględnieniem 3-4 różnych stężeń tych kwasów (Ryc. 29-30).

Erytrocyty ludzkie wymagały 4 – 12-krotnie wyższych stężeń AAA do uzyskania takiego samego stopnia hemolizy jak erytrocyty szczurze.

Zależności stężenie-odpowieź dla RBC, Ht i MCV miały na ogół charakter nie liniowy. Zależności te cechowały się wysokimi wartościami współczynników determinacji (R^2) oraz wysokimi poziomami istotności (Ryc. 31-34). Na podstawie równań regresji opisujących zależności stężenie-odpowieź dla RBC, Ht i MCV obliczono wartości stężeń efektywnych EC_{50} i EC_{25} oraz ich 95% przedziały ufności, które przedstawiono w tab. 11 i tab. 12.

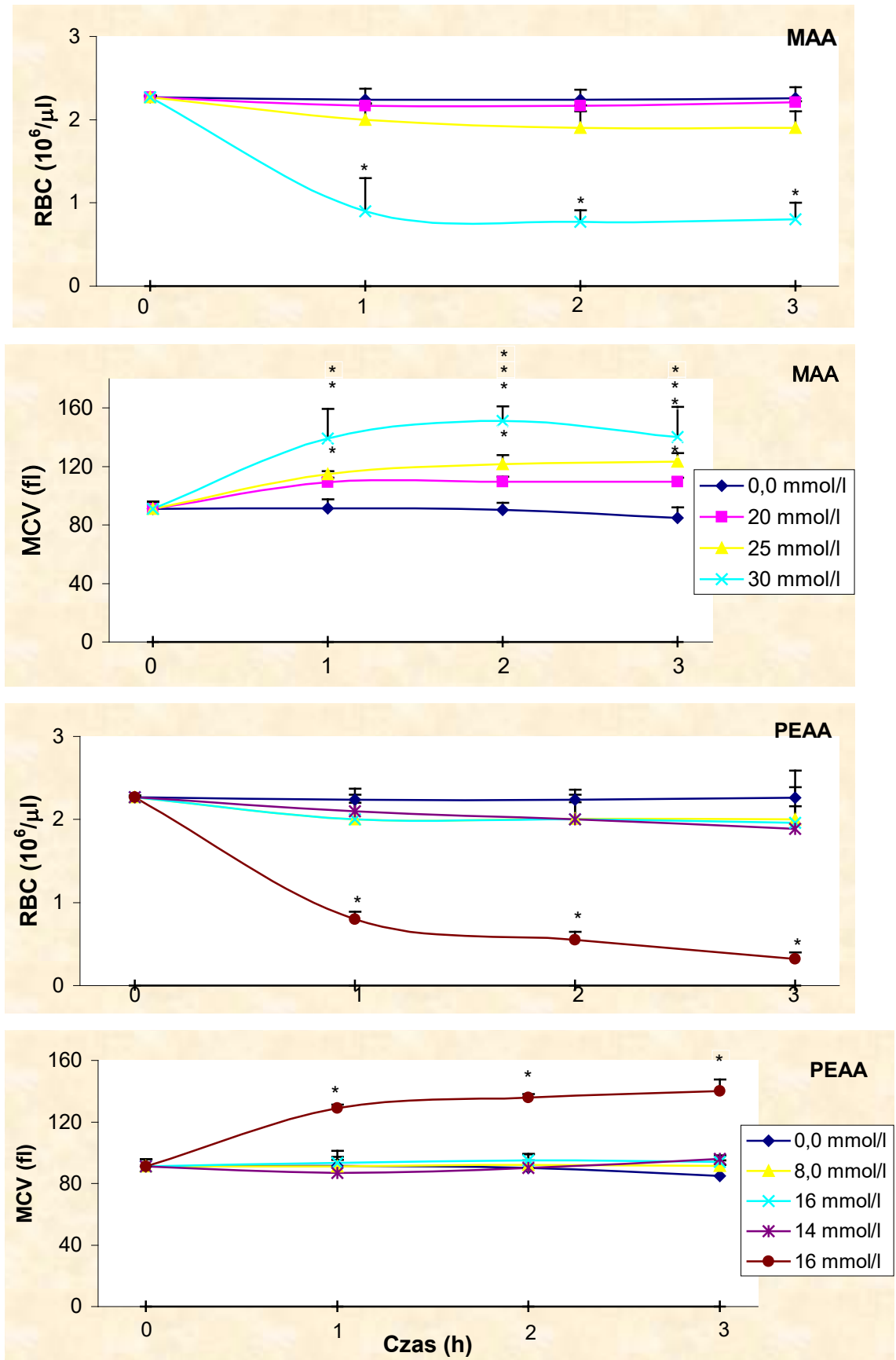
O ile w przypadku erytrocytów szczura wartości EC_{50} dla poszczególnych AAA spadały wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej badanych kwasów i różniły się na ogół między sobą statystycznie znamienne (przedziały ufności nie pokrywały się ze sobą) (Tab. 11), to w przypadku erytrocytów człowieka wartości te spadały w podobnej kolejności, ale rzadziej różniły się znamienne (Tab. 12).

Ponadto, wartości EC_{50} badanych AAA oznaczone na erytrocytach szczura korelowały ujemnie z wartościami Log P i pKa (Ryc. 35). Podobną zależność stwierdzono w przypadku erytrocytów człowieka (Ryc. 36).



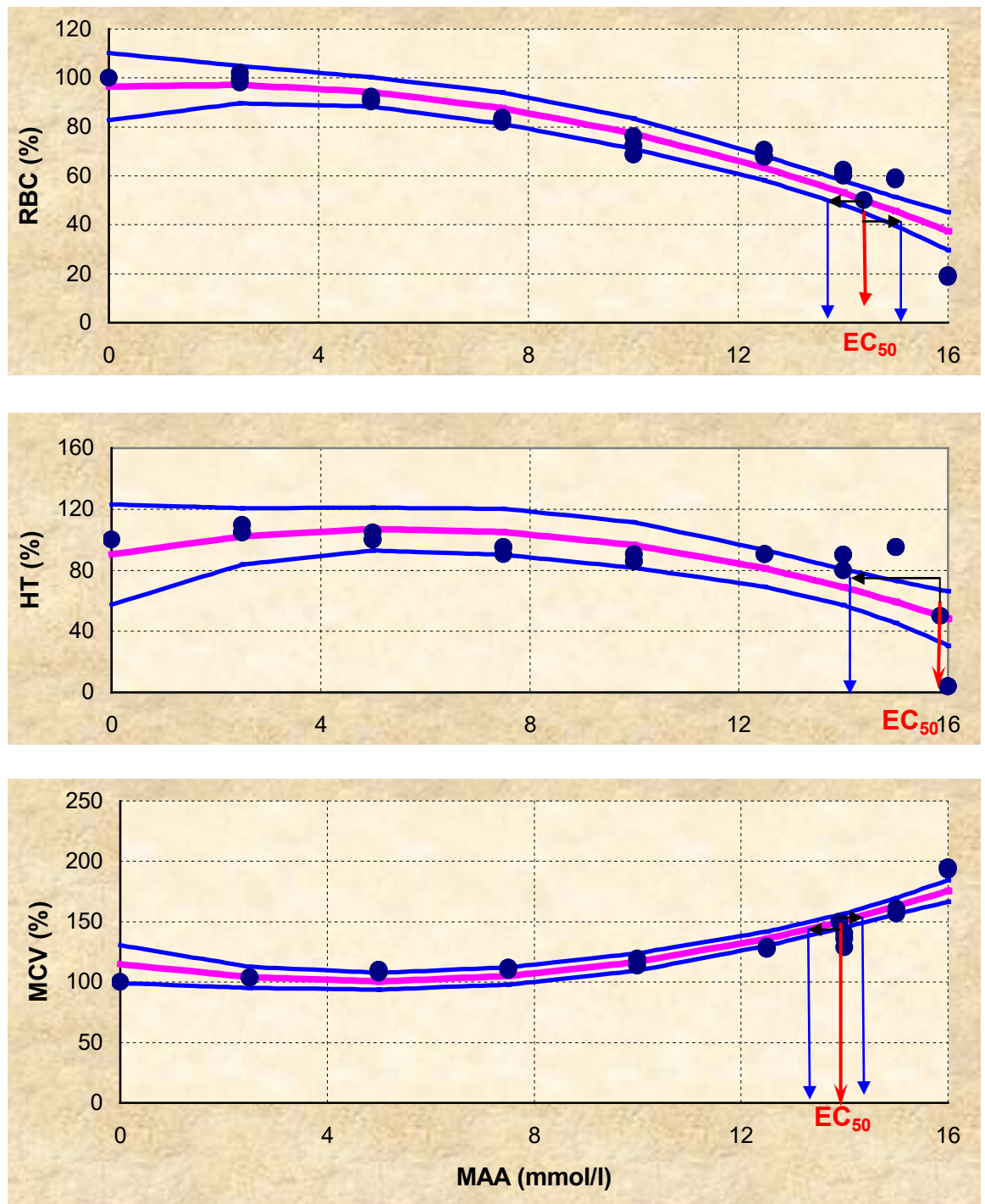
Ryc. 29. Zmiany wartości RBC i MCV w funkcji czasu w przypadku różnych dawek MAA i PEAA, działających na eryocyty szczura *in vitro*.

* $p < 0,001$.

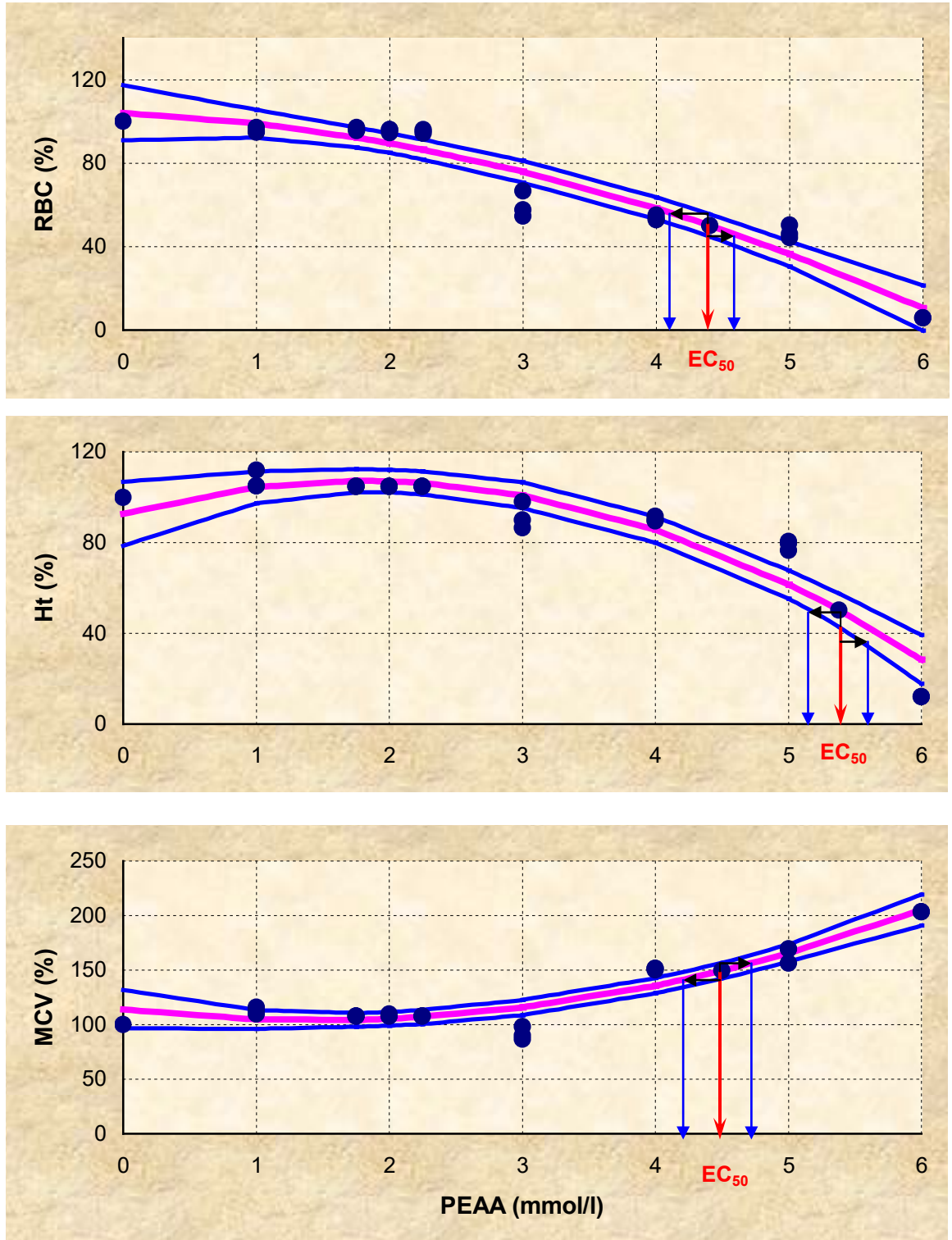


Ryc. 30. Zmiany wartości RBC, MCV w funkcji czasu w przypadku różnych dawek MAA i PEAA działających na erytrocyty człowieka *in vitro*.

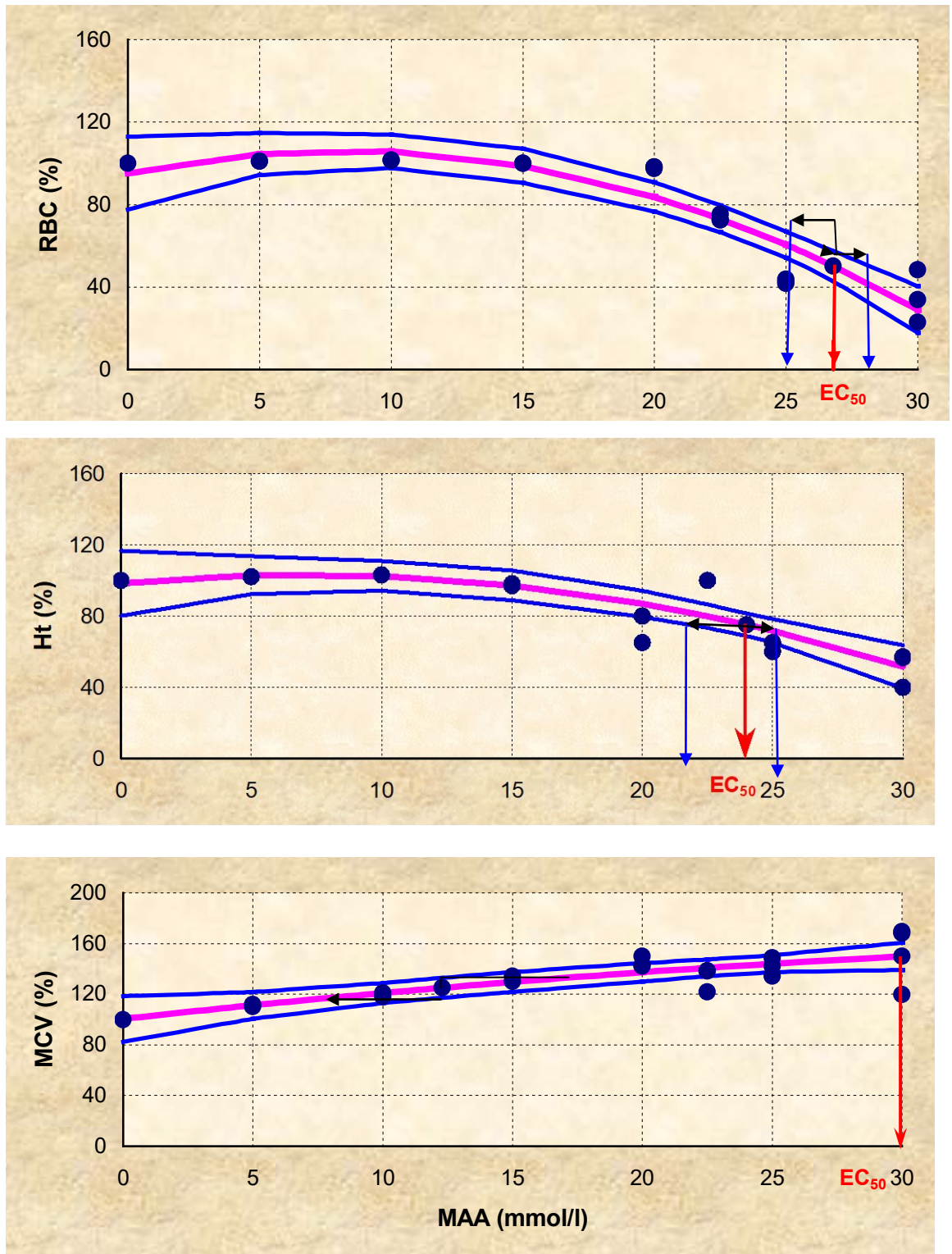
* $p < 0,001$.



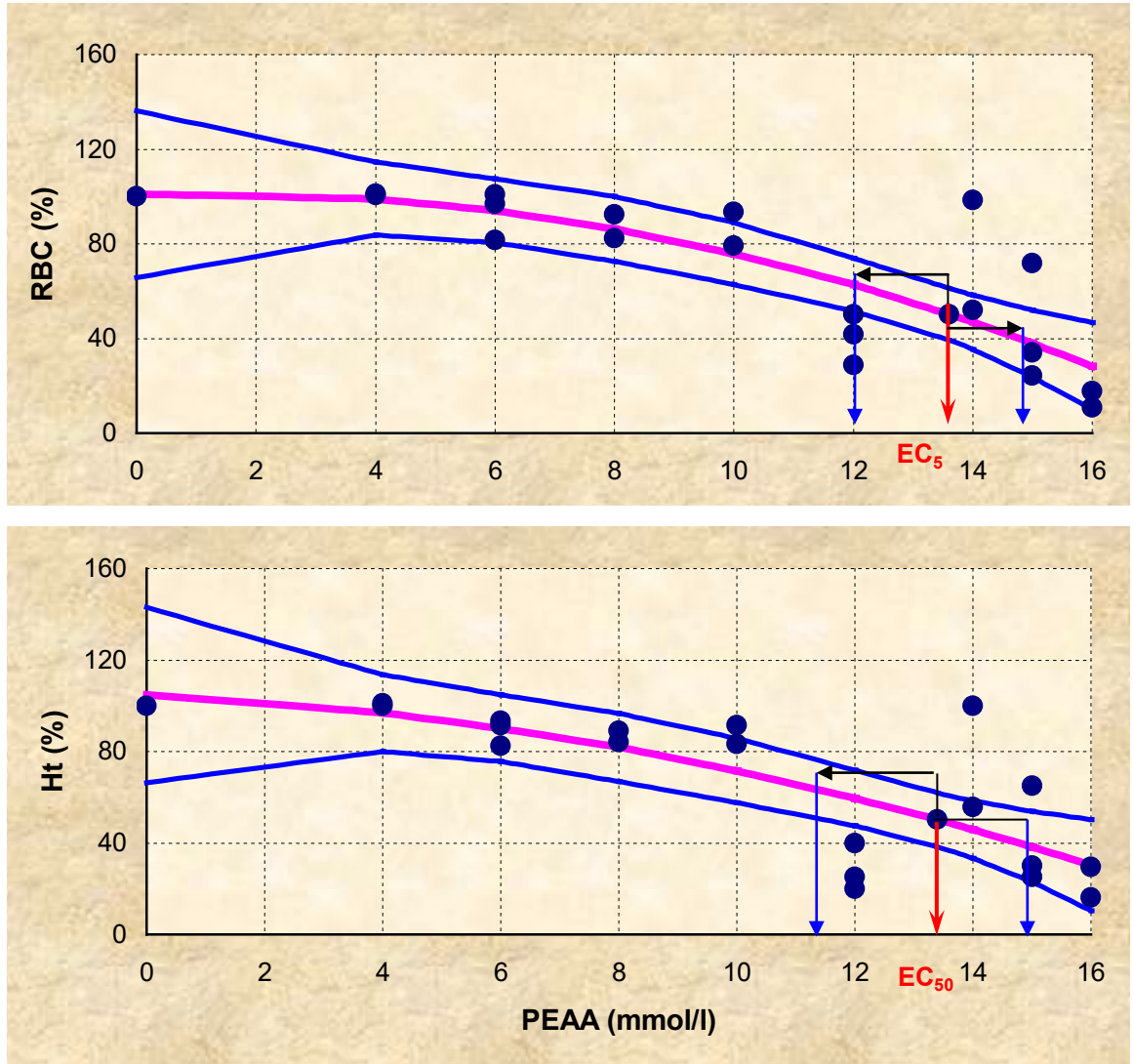
Ryc. 31. Zależności stężenie-odpowiedź dla zmian RBC, Ht i MCV erytrocytów szczura *in vitro*. Krzywe regresji z 95% przedziałami ufności.



Ryc. 32. Zależności stężenie-odpowiedź dla zmian RBC, Ht i MCV erytrocytów szczura *in vitro*. Krzywe regresji z 95% przedziałami ufności.



Ryc. 33. Zależności stężenie-odpowiedź dla zmian RBC, Ht i MCV erytrocytów człowieka *in vitro*. Krzywe regresji z 95% przedziałami ufności.



Ryc. 34. Zależności stężenie-odpowiedź dla zmian RBC i Ht erytrocytów człowieka *in vitro*. Krzywe regresji z 95% przedziałami ufności.

Tab. 11. Wartości EC_{50} dla AAA oparte na zmianach RBC, Ht i MCV w erytrocytach szczurzych.

Wskaźnik hematologiczny	Badany AAA	EC_{50} (mmol/l)	95% CI dla regresji	Równanie regresji	R^2	$p \leq$
RBC	MAA	14,4	13,7 - 15,1	$y = -0,3x^2 + 1,0x + 96,6$	0,849	0,0001
	EAA	10,45	8,4 - 12,4	$y = -0,04x^2 - 3,2x + 87,3$	0,666	0,0001
	PAA	8,78	8,3 - 9,3	$y = -0,5x^2 - 0,6x + 96,3$	0,872	0,0001
	BAA	4,78	4,5 - 5,0	$y = -2,7x^2 + 4,0x + 90,8$	0,828	0,0001
	PEAA	4,4	4,1 - 4,6	$y = -2,1x^2 - 3,1x + 104,1$	0,910	0,0001
Ht	MAA	15,86	14,2 - 17,3	$y = -0,5x^2 + 6,0x + 90,4$	0,472	0,0001
	EAA	9,78*	6,0 - 12,4	$y = -0,2x^2 + 0,6x + 89,4$	0,427	0,0117
	PAA	9,75*	8,3 - 11,0	$y = -0,7x^2 + 5,1x + 97,2$	0,397	0,0038
	BAA	5,43	5,1 - 5,7	$y = -5,0x^2 + 20,2x + 88,9$	0,761	0,0001
	PEAA	5,38	5,1 - 5,6	$y = -4,5x^2 + 16,1x + 92,8$	0,872	0,0001
MCV	MAA	13,9	13,4 - 14,4	$y = 0,6x^2 - 5,8x + 114,9$	0,869	0,0001
	EAA	10,62	9,2 - 11,9	$y = 0,3x^2 + 1,4x + 105,5$	0,739	0,0001
	PAA	7,63	6,7 - 8,5	$y = 0,5x^2 + 2,1x + 101,3$	0,652	0,0001
	BAA	2,6*	1,9 - 3,4	$y = -0,6x^2 + 11,4x + 99,2$	0,584	0,0001
	PEAA	4,5	4,2 - 4,7	$y = 4,9x^2 - 14,1x + 114,1$	0,881	0,0001

95% CI = 95% przedział ufności

* wartość EC_{25}

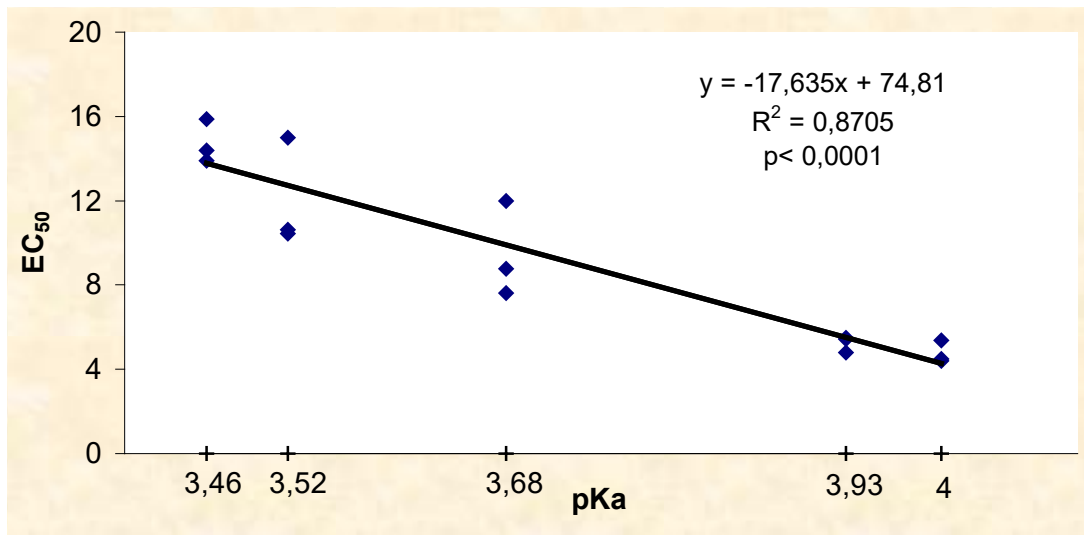
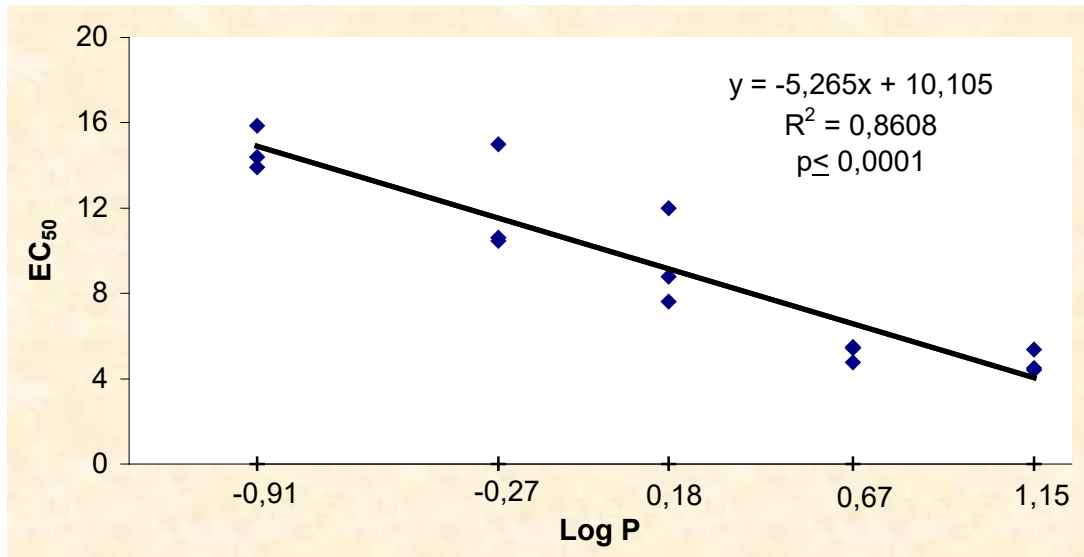
Tab. 12. Wartości EC₅₀ dla AAA oparte na zmianach RBC, Ht i MCV w erytrocytach człowieka.

Wskaźnik hematologiczny	Badany AAA	EC ₅₀ (mmol/l)	95% CI dla regresji	Równanie regresji	R ²	p ≤
RBC	MAA	26,8	25,55 – 28,0	$y = -0,163x^2 + 2,7x + 95,2$	0,886	0,0001
	EAA	22,2	20,3 - 23,9	$y = -0,1x^2 - 0,6x + 97,57$	0,795	0,0001
	PAA	18,3	17,9 - 18,7	$y = -0,3x^2 + 4,0x + 94,6$	0,966	0,0001
	BAA	14,4	13,0 - 15,6	$y = -0,3x^2 + 1,2x + 93,4$	0,690	0,0001
	PEAA	13,6	12,2 - 14,7	$y = -0,34x^2 + 0,85x + 101,1$	0,650	0,0001
Ht	MAA	24*	21,9 - 25,8	$y = -0,1x^2 + 1,4x + 98,4$	0,718	0,0001
	EAA	20,7*	19,1 - 22,1	$y = -0,1x^2 + 1,8x + 97,4$	0,757	0,0001
	PAA	19,5	18,8 - 20,2	$y = -0,4x^2 + 4,8x + 93,7$	0,904	0,0001
	BAA	13,1	12,4 - 13,7	$y = -0,2x^2 - 1,1x + 103,6$	0,917	0,0001
	PEAA	13,4	11,6 - 15,0	$y = -0,2x^2 - 1,1x + 104,7$	0,588	0,0001
MCV	MAA	12,3*	8,0 - 17,0	$y = -0,02x^2 + 2,3x + 100,5$	0,616	0,0001
	EAA	11,3*	9,5 - 13,2	$y = -0,04x^2 + 2,9x + 97,0$	0,805	0,0001
	PAA	17,6*	16,2 - 18,8	$y = 0,1x^2 - 1,3x + 104,0$	0,719	0,0001
	BAA	—	—	$y = 0,06x^2 - 1,9x + 109,7$	0,039	0,707
	PEAA	—	—	$y = 0,3x^2 - 3,7x + 108,4$	0,139	0,279

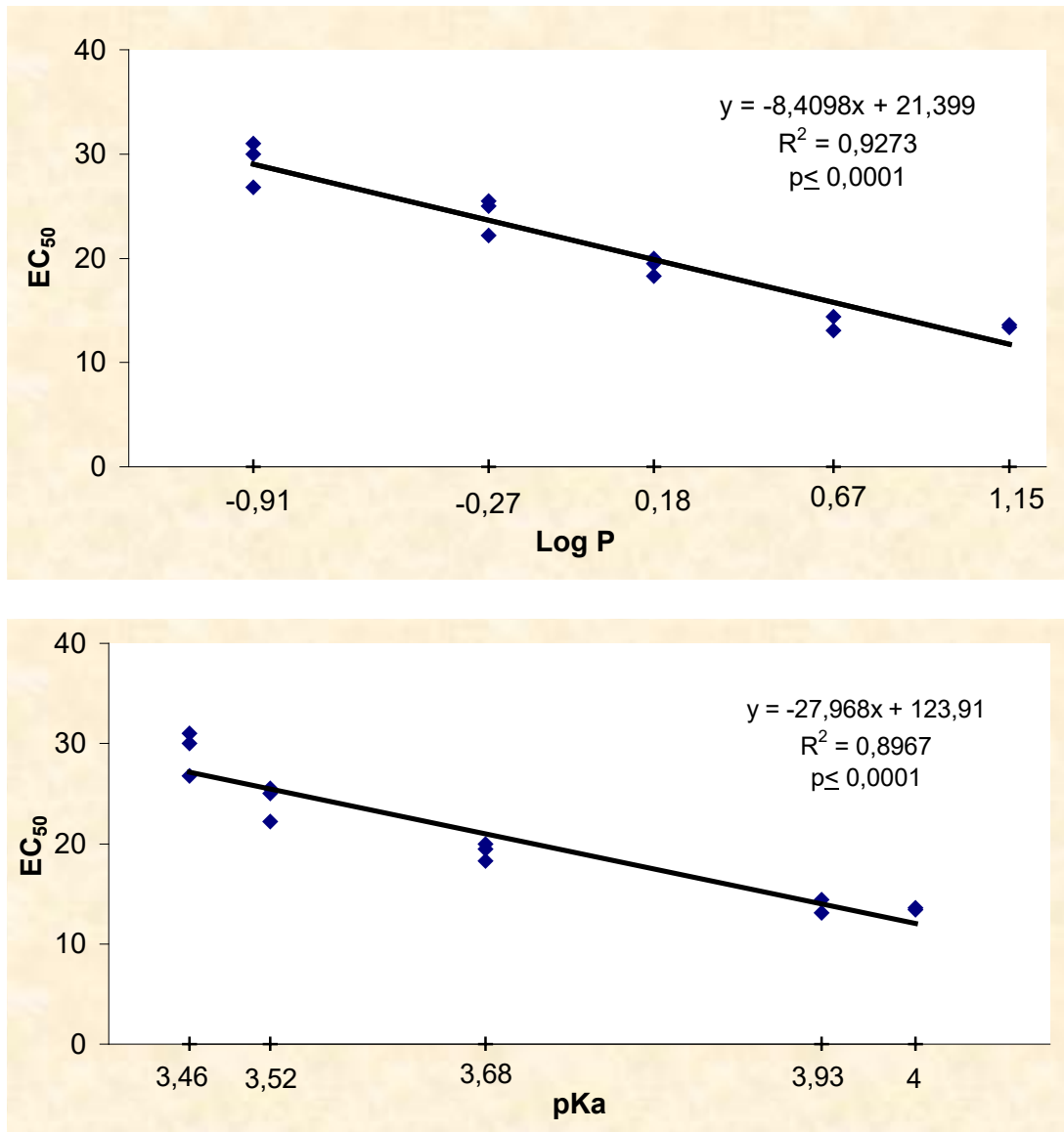
95% CI = 95% przedział ufności

— nie podano ze względu na brak istotności statystycznej

* wartość EC₂₅



Ryc. 35. Korelacje pomiędzy EC_{50} AAA a Log P lub pK_a na podstawie zmian RBC, Ht i MCV erytrocytów szczura.

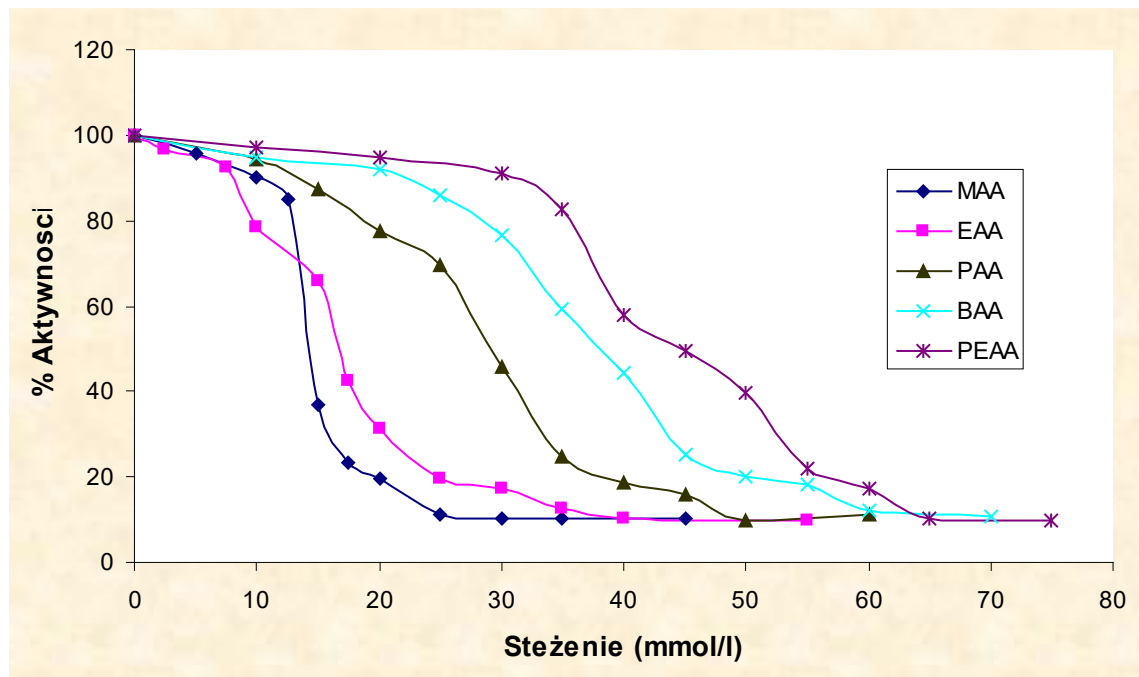


Ryc. 36. Korelacje pomiędzy EC_{50} AAA a Log P lub pKa na podstawie zmian RBC, Ht i MCV erytrocytów człowieka.

5.4 Wpływ AAA na aktywność komercyjnej Na⁺/K⁺-ATPazy

Wszystkie kwasy alkoksyoctowe hamowały aktywność komercyjnej Na⁺/K⁺-ATPazy przyjętej za enzym referencyjny. Krzywe dla zależności pomiędzy aktywnością enzymu wyrażoną w procentach wartości wyjściowej (aktywność enzymu przy braku inhibitora), przyjętej za 100%, a stężeniem inhibitora w medium inkubacyjnym miały typowy przebieg sigmoidalny (Ryc. 37).

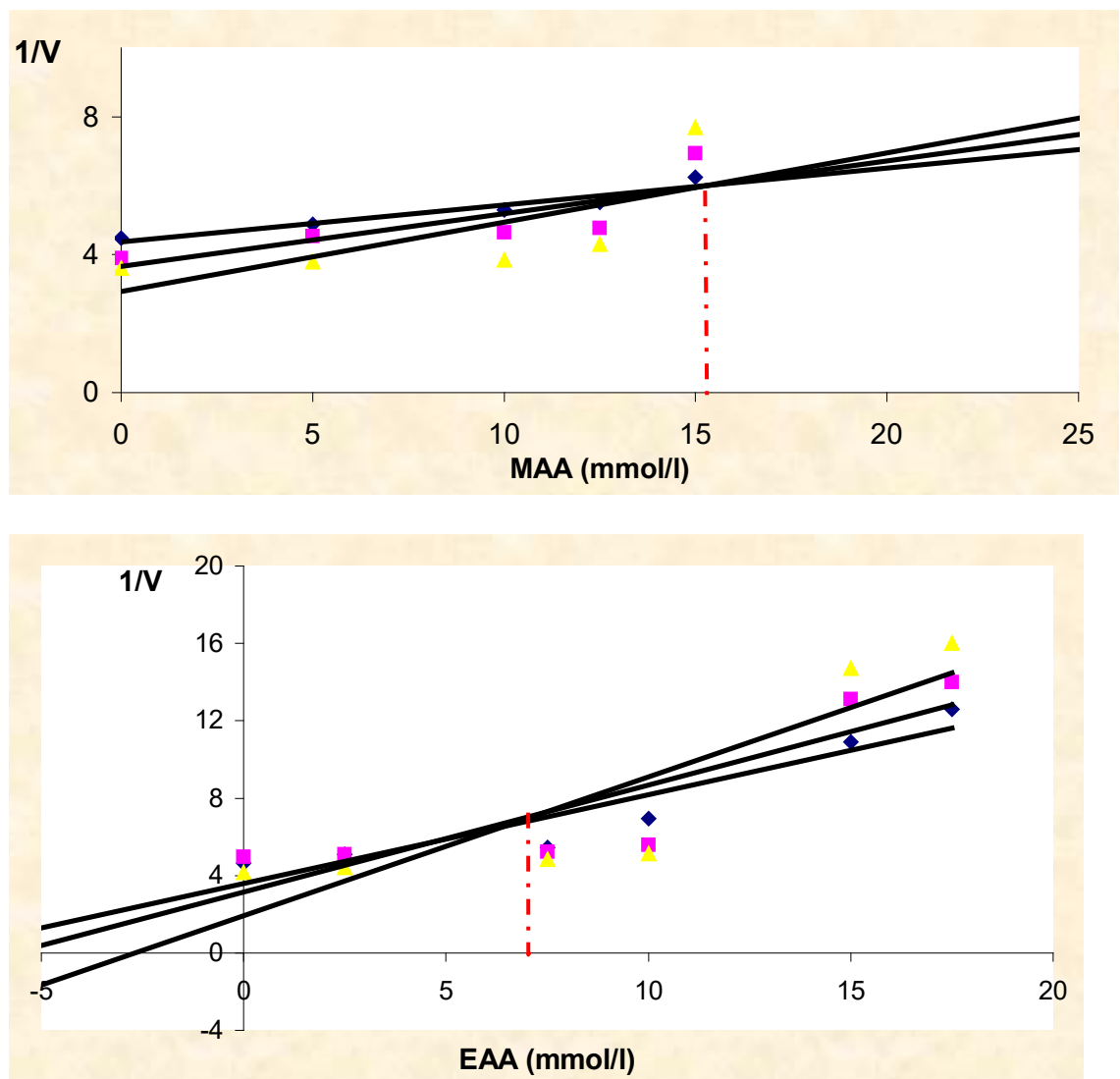
Wszystkie AAA spowodowały spadek wyjściowej aktywności enzymu o 90%, ale przy różnych stężeniach w zakresie 25 – 65 mmol/l (Ryc. 37). Miarą siły działania inhibicyjnego badanych kwasów są wartości IC₅₀, czyli stężenia powodujących spadek początkowej aktywności enzymu o 50%. Wartości IC₅₀ rosły wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej AAA, czyli długością łańcucha alkilowego (Tab. 13).



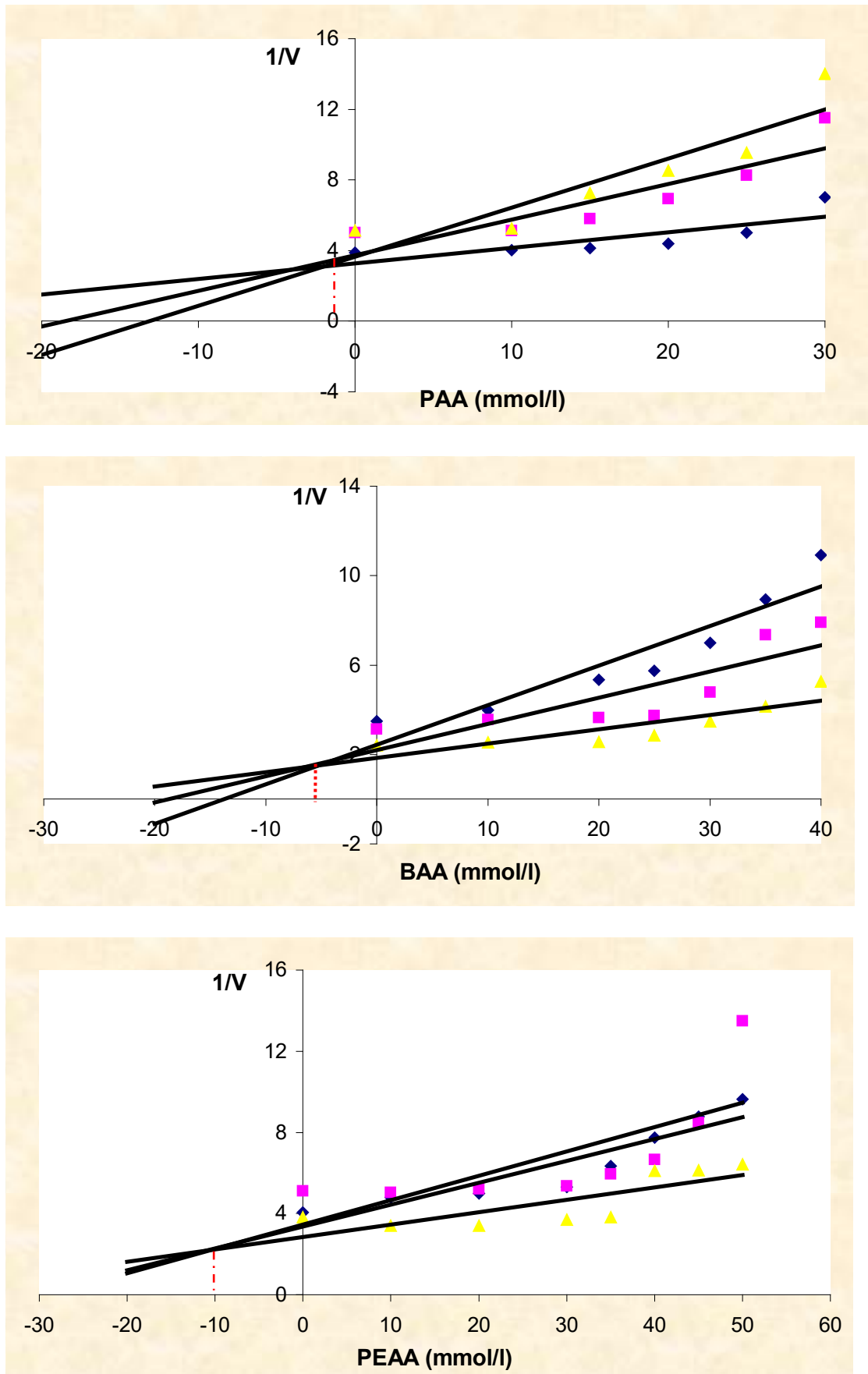
Ryc. 37. Zmiany aktywności Na⁺/K⁺-ATPazy komercyjnej w obecności AAA. Pomiary aktywności enzymu wykonano przy stężeniach ATP wynoszących 0,5, 1,0, 1,5 mmol/l. Aktywność wyjściowa = 0,273±0,05 μmol/mg białka/min. Każdy punkt jest średnią z 3 niezależnych doświadczeń przy 3 różnych stężeniach ATP.

W celu wyjaśnienia charakteru hamowania aktywności komercyjnej Na^+/K^+ -ATPazy przez badane kwasy alkoksyoctowe wyznaczono stałe inhibicji (K_i) metodą Dixona oraz określono typ hamowania. Ryc. 38 – 39 ilustrują sposób wykreślenia krzywych Dixona. Hamowanie to miało charakter kompetycyjny.

Na podstawie zależności $1/V_i$ od stężenia inhibitora dla 3 różnych stężeń ATP wyznaczono średnie wartości K_i , które wynoszą dla MAA, EAA, PAA, BAA, PEAA odpowiednio $0,15 \times 10^2$, $0,073 \times 10^2$, $1,54 \times 10^{-2}$, $0,5 \times 10^{-2}$, $0,1 \times 10^{-2}$ mmol/l (Tab. 13).



Ryc. 38. Krzywe Dixona dla hamowania aktywności komercyjnej Na^+/K^+ -ATPazy przez MAA i EAA.



Ryc. 39. Krzywe Dixona dla hamowania aktywności komercyjnej Na^+/K^+ -ATPazy przez PAA, BAA i PEAA.

Tab. 13. Wartości K_i dla komercyjnej Na^+/K^+ -ATPazy.

AAA	K_i (mmol/l)	IC_{50} (mmol/l)
MAA	$0,15 \times 10^2$	13
EAA	$0,073 \times 10^2$	16
PAA	$1,54 \times 10^{-2}$	29
BAA	$0,5 \times 10^{-2}$	38
PEAA	$0,1 \times 10^{-2}$	44

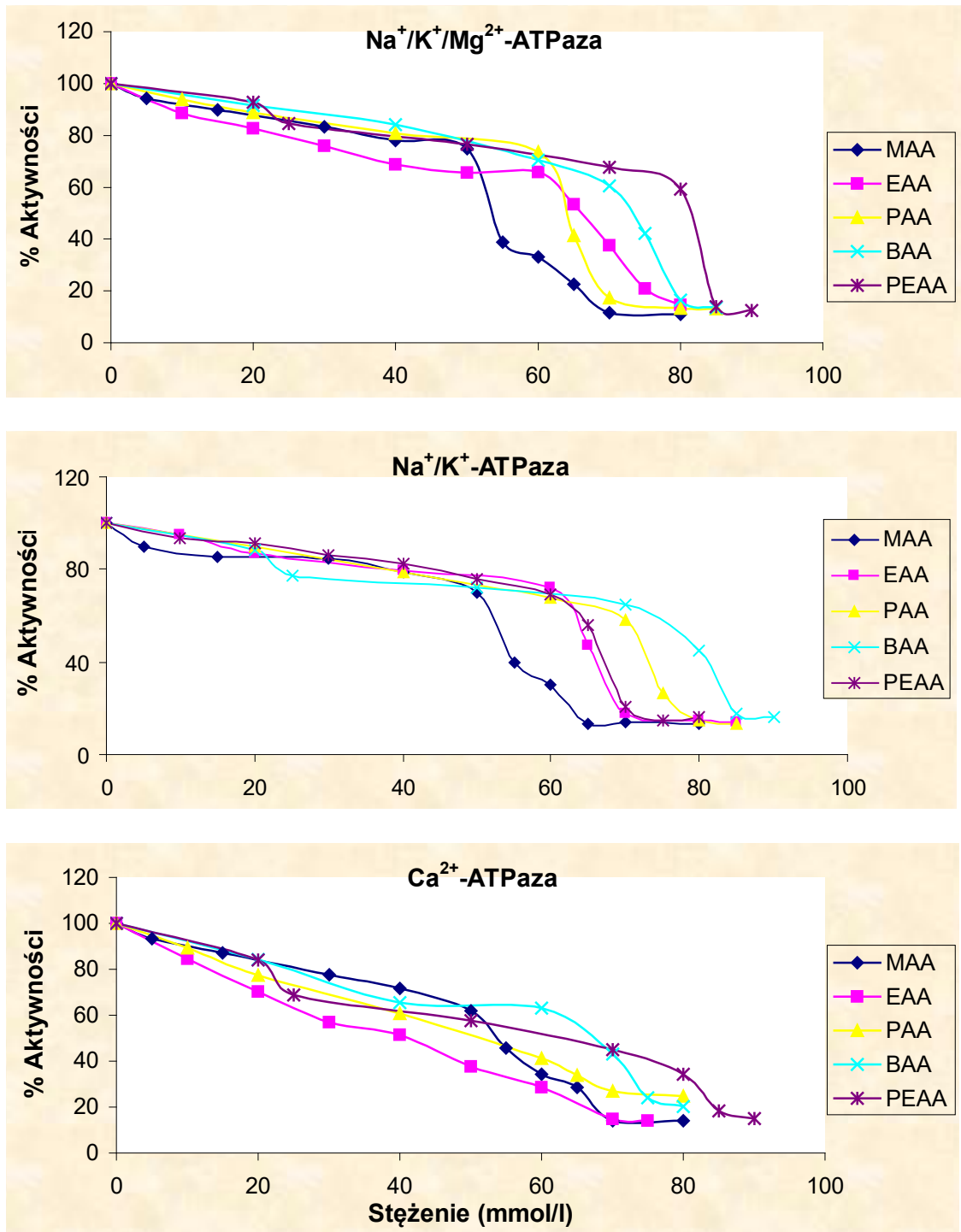
5.5 Wpływ AAA na aktywność ATPaz w cieniach erytrocytów szczura i człowieka

Wszystkie AAA wykazywały hamujące działanie na ATPazy w cieniach erytrocytów szczura i człowieka. Działanie to było najsilniej zaznaczone w przypadku Na^+/K^+ -ATPazy i Ca^{+2} -ATPazy (Ryc. 40, Ryc. 41). Hamujące działanie badanych kwasów na Mg^{+2} -ATPazę było najslabiej zaznaczone i nie zależało od rodzaju badanego kwasu. Dlatego pominięto ilustracje tego zjawiska.

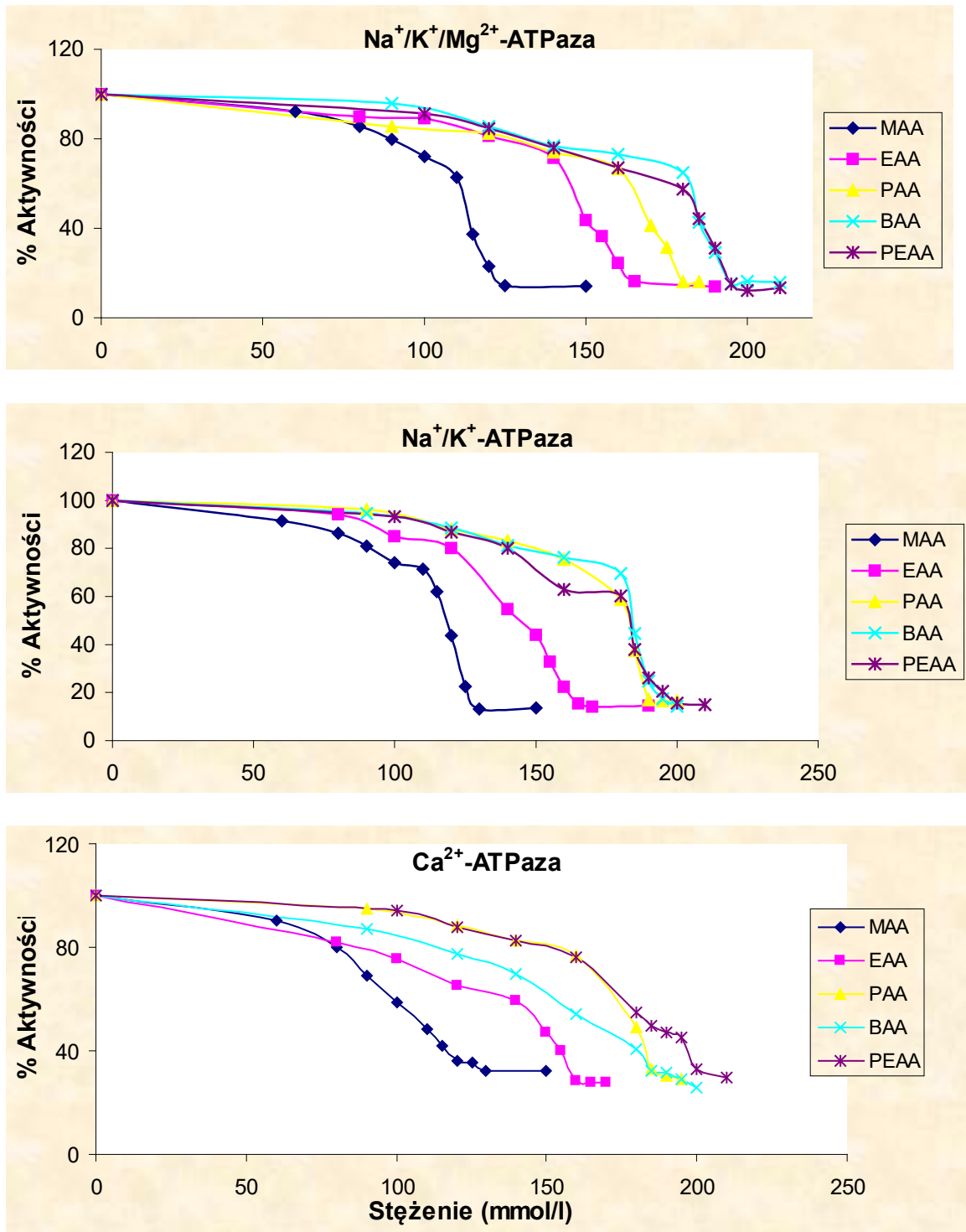
Podobnie jak w przypadku komercyjnej Na^+/K^+ -ATPazy hamowanie ATPaz w cieniach erytrocytów szczura i człowieka miało charakter kompetycyjny (Ryc. 42-51). Siła działania hamującego wyrażona wartościami K_i , malała z długością łańcucha alkilowego, co znalazło wyraz w spadku bezwzględnej wartości tego wskaźnika (Tab. 14).

W przypadku ATPaz w cieniach erytrocytów szczura i człowieka zakres stężeń AAA, które hamowały enzym był znacznie wyższy niż w przypadku Na^+/K^+ -ATPazy komercyjnej. Świadczy to o mniejszej wrażliwości enzymów błonowych od enzymu izolowanego.

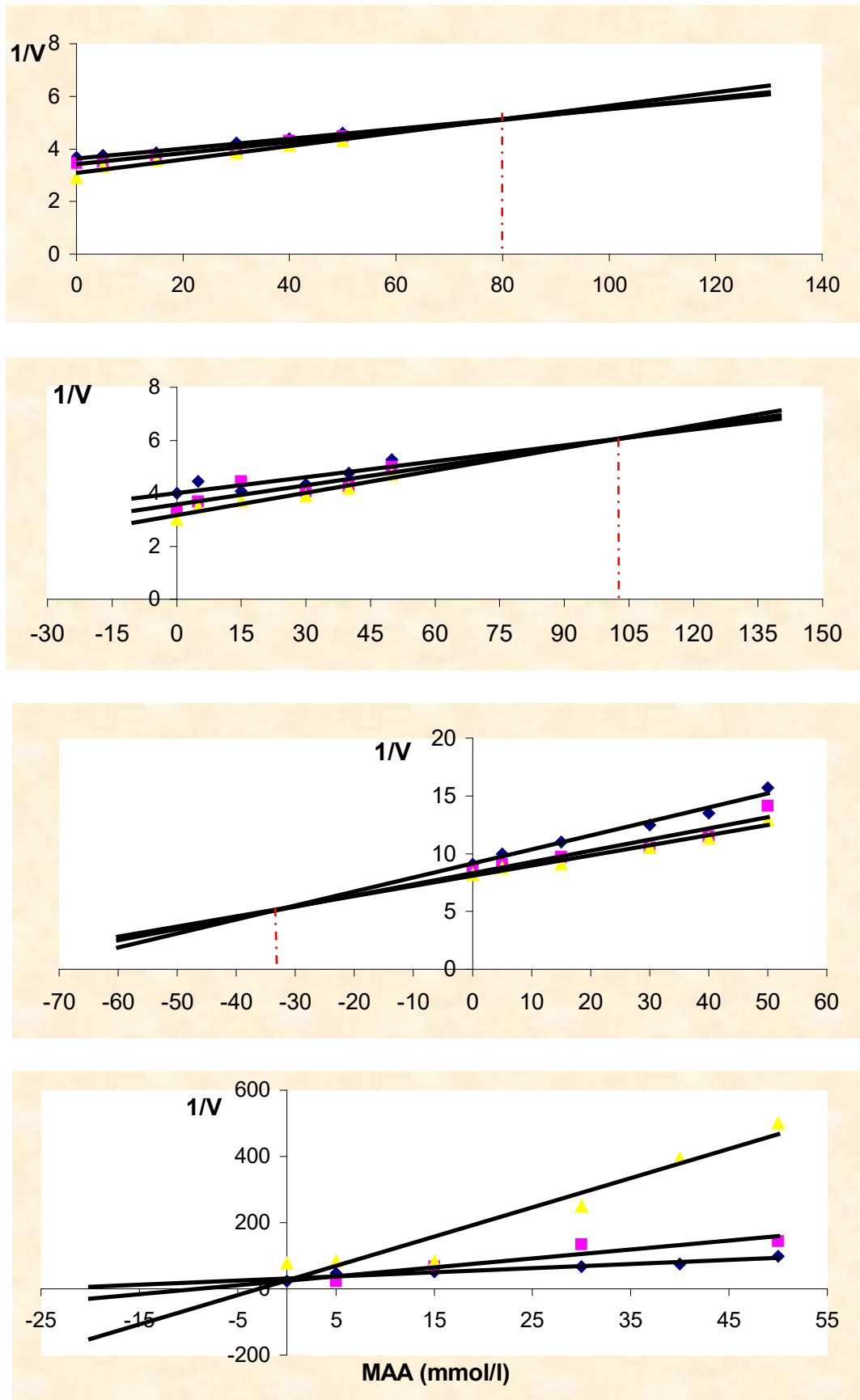
ATPazy z „cieni” erytrocytów szczura były bardziej wrażliwe od ATPaz z „cieni” erytrocytów człowieka, na co wskazuje zakres stężeń AAA hamujących enzymy oraz wartości K_i .



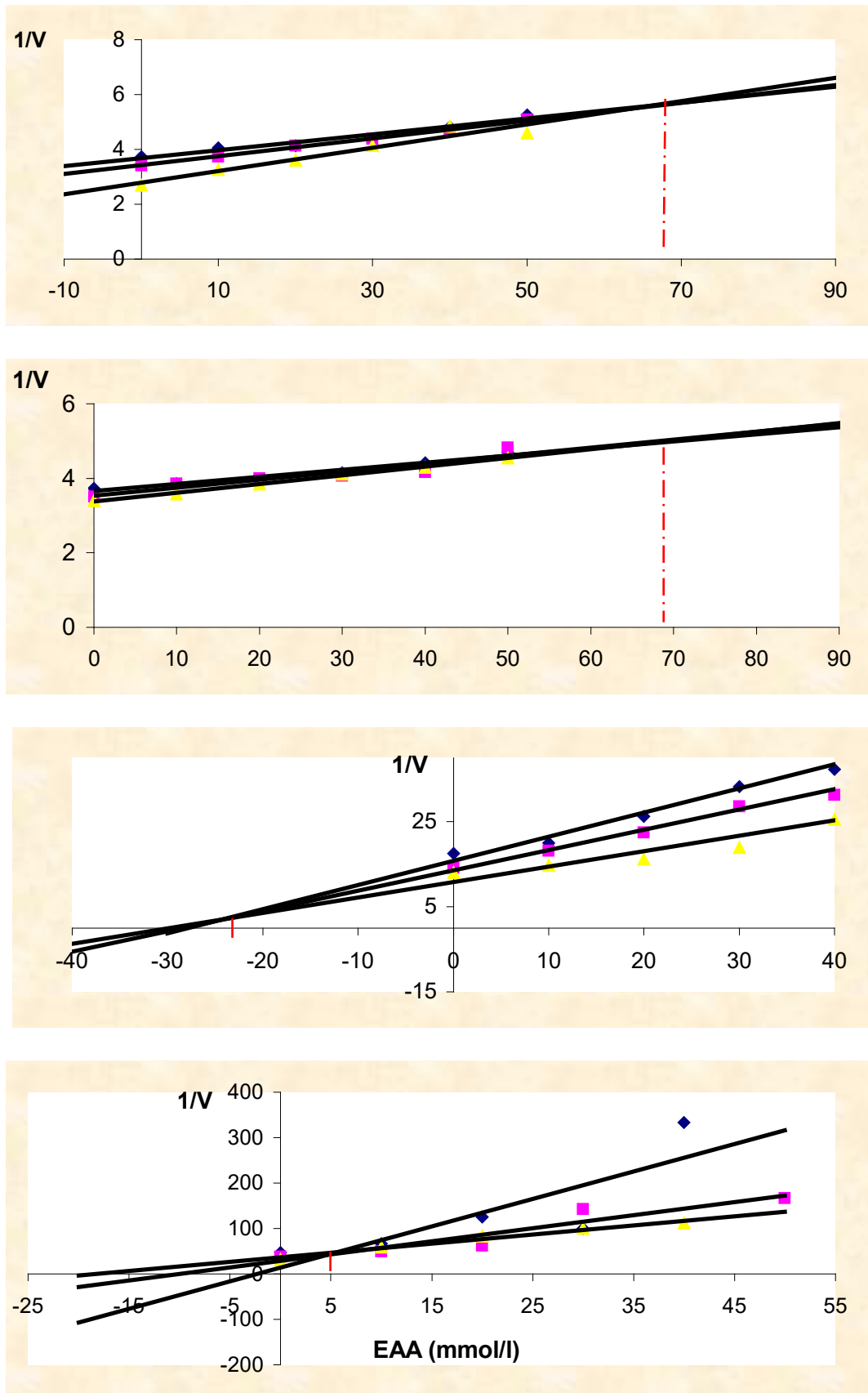
Ryc. 40. Zmiany aktywności Na⁺/K⁺/Mg²⁺-ATPazy, Na⁺/K⁺-ATPazy oraz Ca²⁺-ATPazy w obecności AAA w erytrocytach szczura. Pomiar aktywności enzymu wykonano przy stężeniach ATP wynoszących 1,5 - 2,5 mmol/l. Aktywność wyjściowa Na⁺/K⁺/Mg²⁺-ATPazy, Na⁺/K⁺-ATPazy i Ca²⁺-ATPazy wynosiły odpowiednio 0,3±0,02, 0,27±0,02 i 0,12±0,04 μmol/mg białka/min. Każdy punkt jest średnią z 3 niezależnych doświadczeń przy 3 różnych stężeniach ATP.



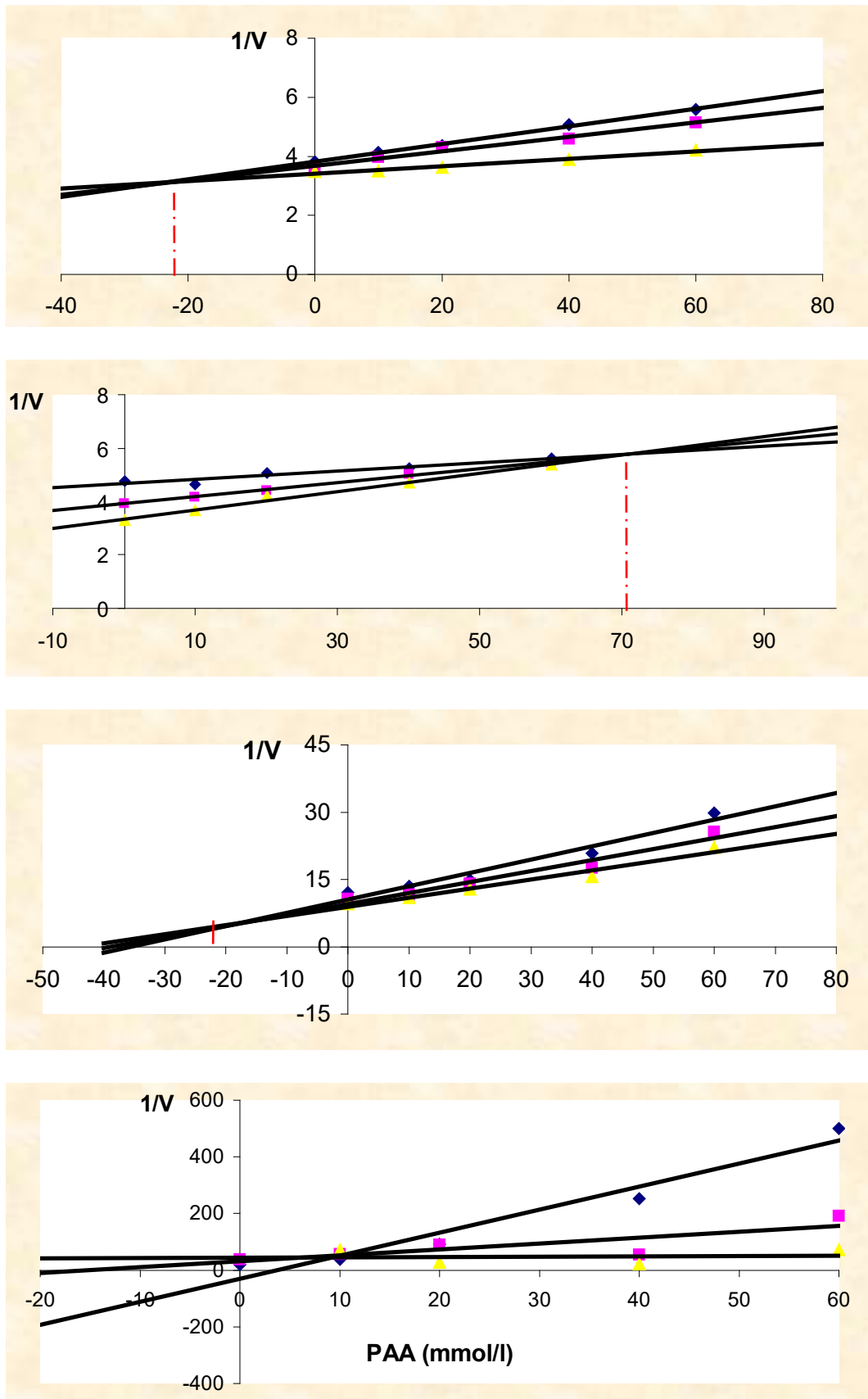
Ryc. 41. Zmiany aktywności Na⁺/K⁺/Mg²⁺-ATPazy, Na⁺/K⁺-ATPazy oraz Ca²⁺-ATPazy w obecności AAA w erytrocytach człowieka. Pomiar aktywności enzymu wykonano przy stężeniach ATP wynoszącej 1,5- 2,5 mmol/l. Aktywność wyjściowa Na⁺/K⁺/Mg²⁺-ATPazy, Na⁺/K⁺-ATPazy i Ca²⁺-ATPazy wynosiły odpowiednio 0,27±0,02, 0,23±0,03 i 0,09±0,02 μmol/mg białka/min. Każdy punkt jest średnią z 3 niezależnych doświadczeń przy 3 różnych stężeniach ATP.



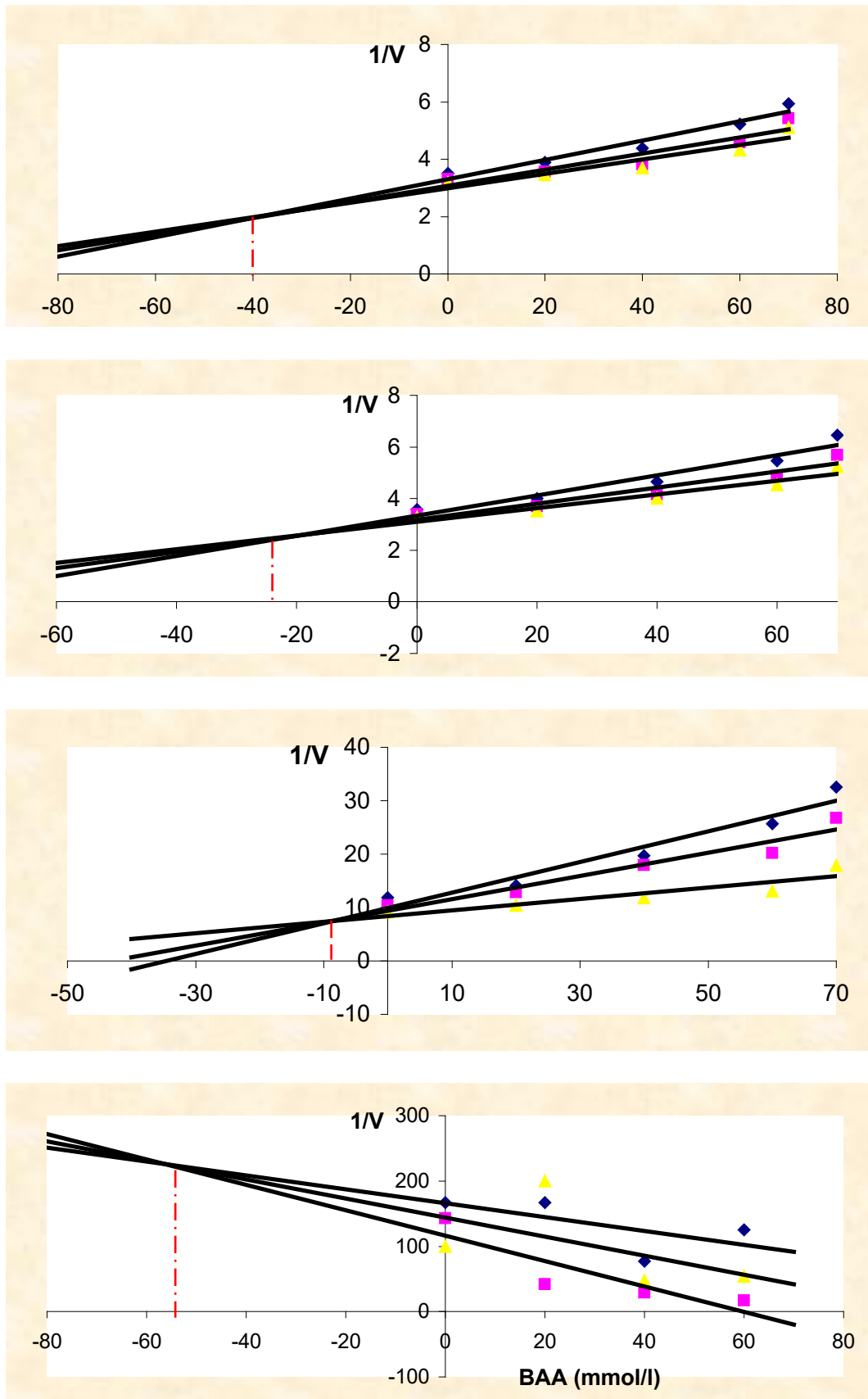
Ryc. 42. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy oraz Mg^{2+} -ATPazy przez MAA w „cieniach” erytrocytów szczura.



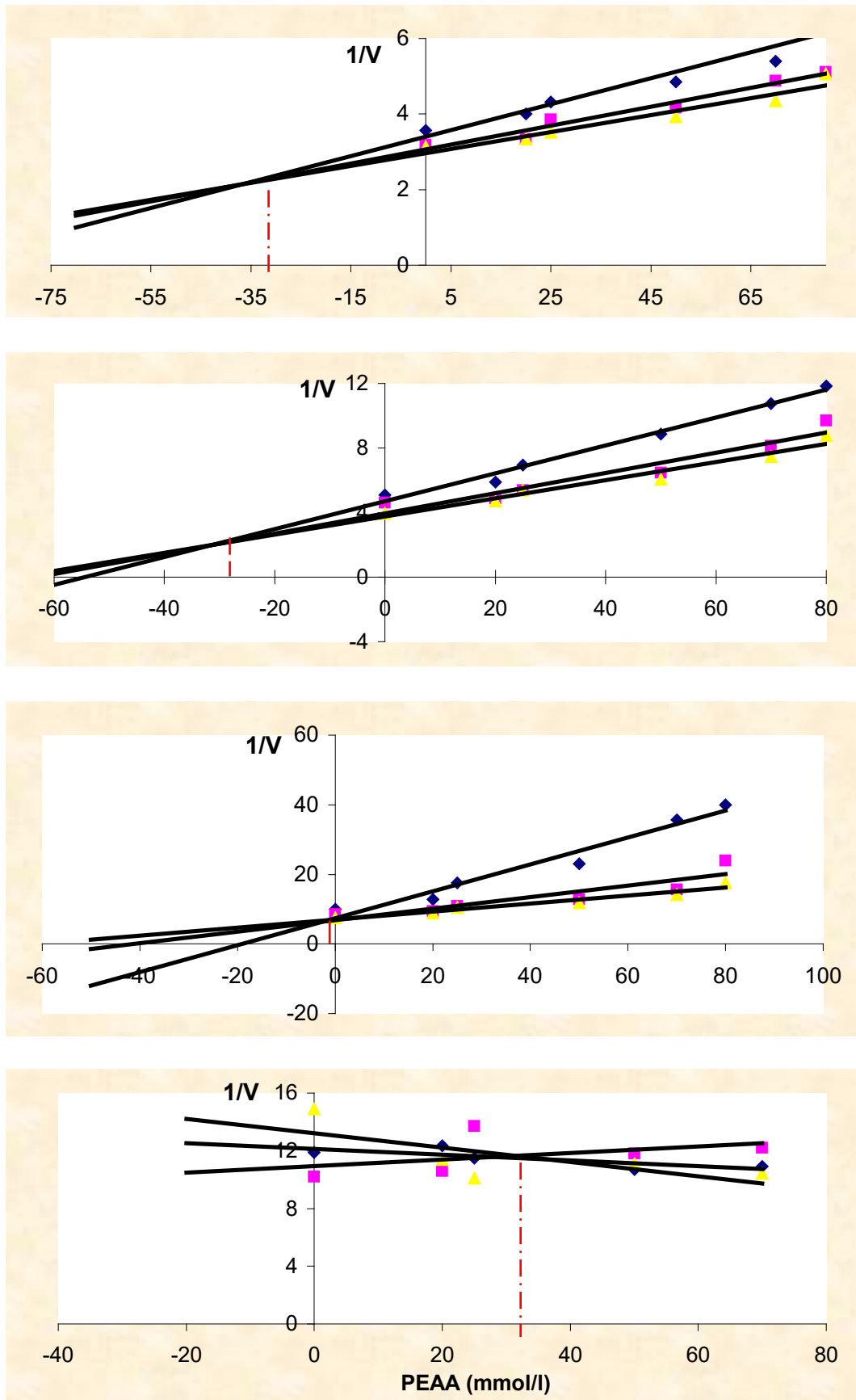
Ryc. 43. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{+2} -ATPazy oraz Mg^{+2} -ATPazy przez EAA w „cieniach” erytrocytów szczura.



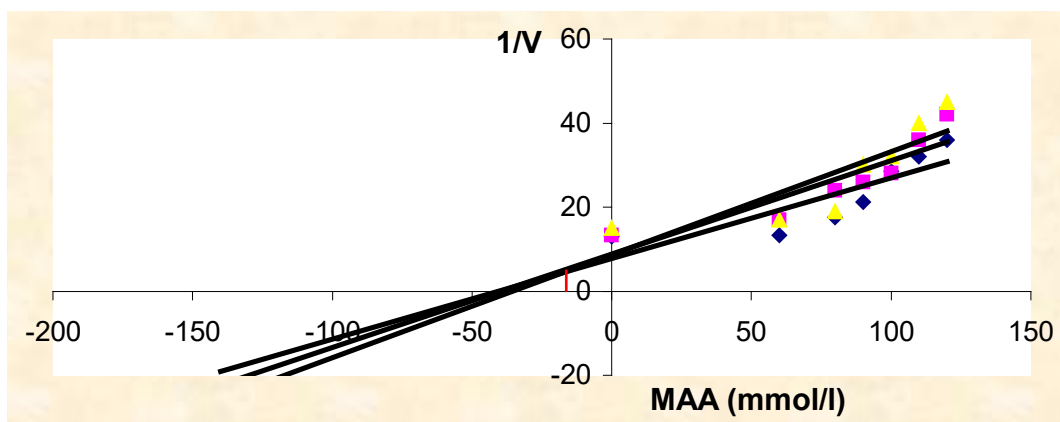
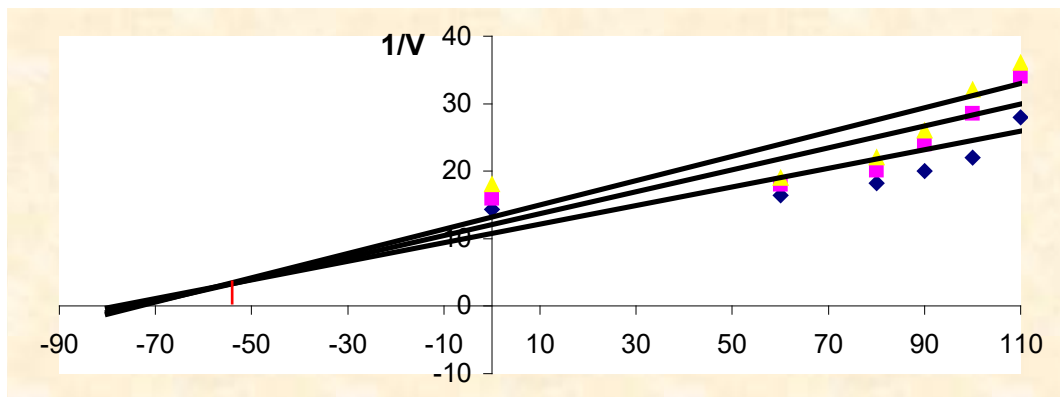
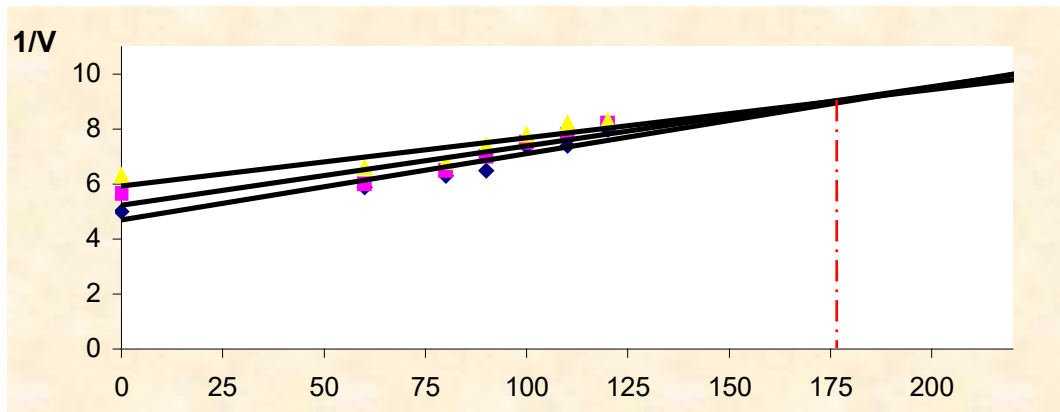
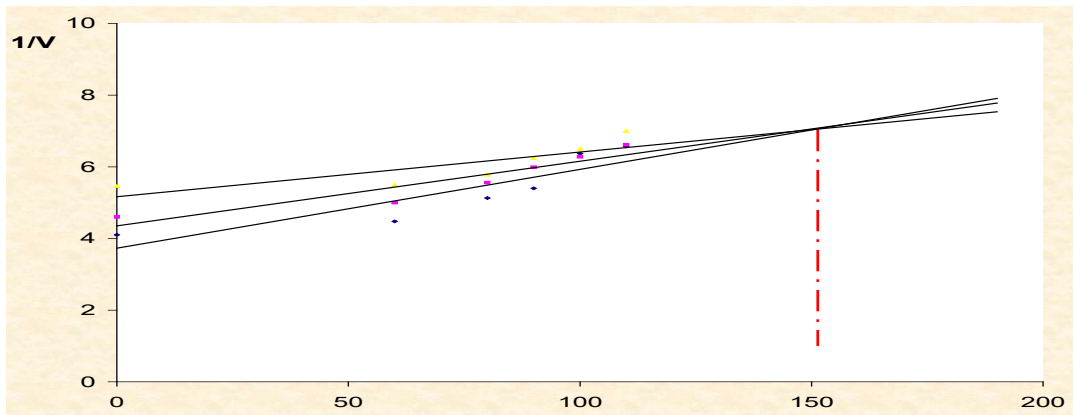
Ryc. 44. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{+2} -ATPazy oraz Mg^{+2} -ATPazy przez PAA w „cieniach” erytrocytów szczura.



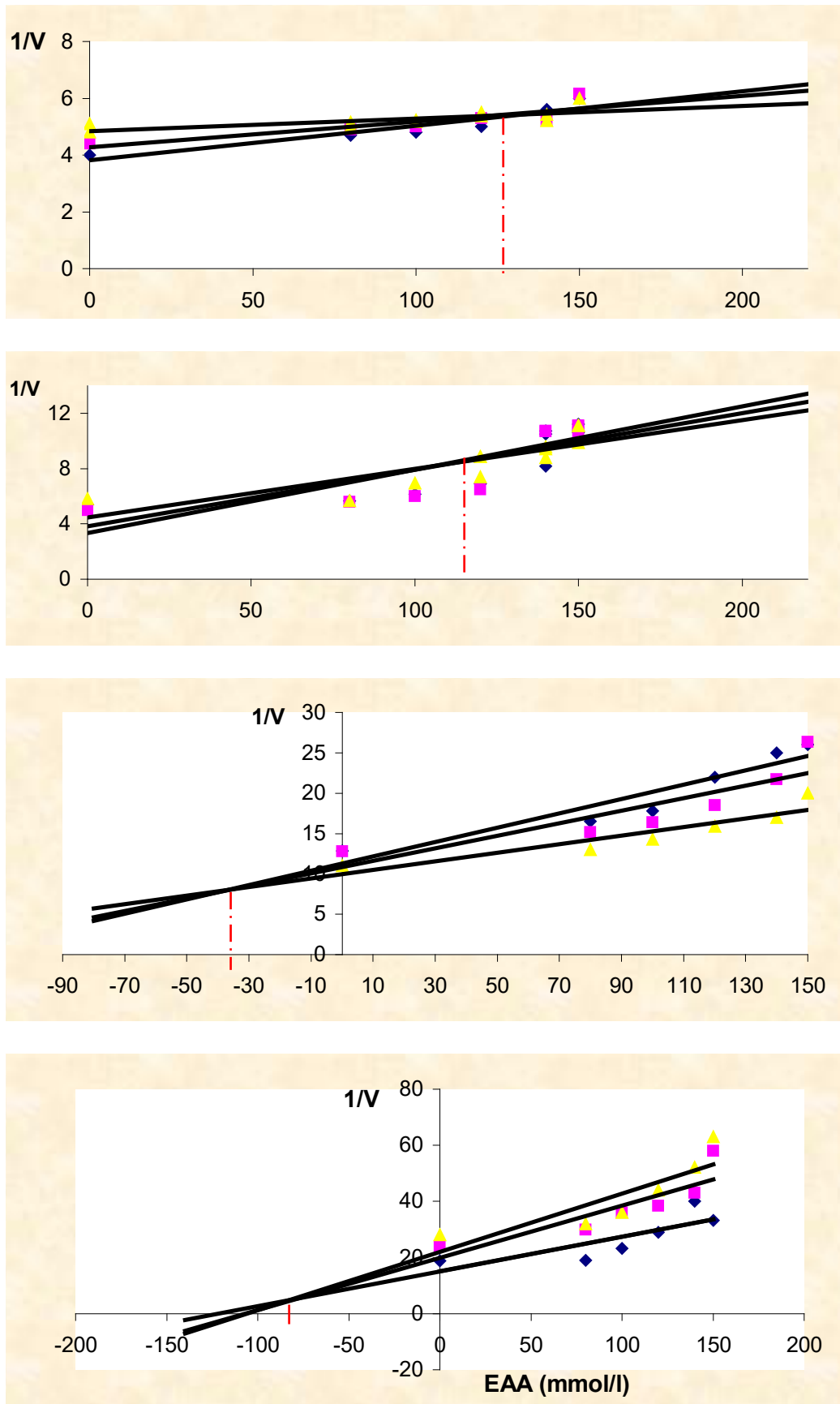
Ryc. 45. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy oraz Mg^{2+} -ATPazy przez BAA w „cieniach” erytrocytów szczura.



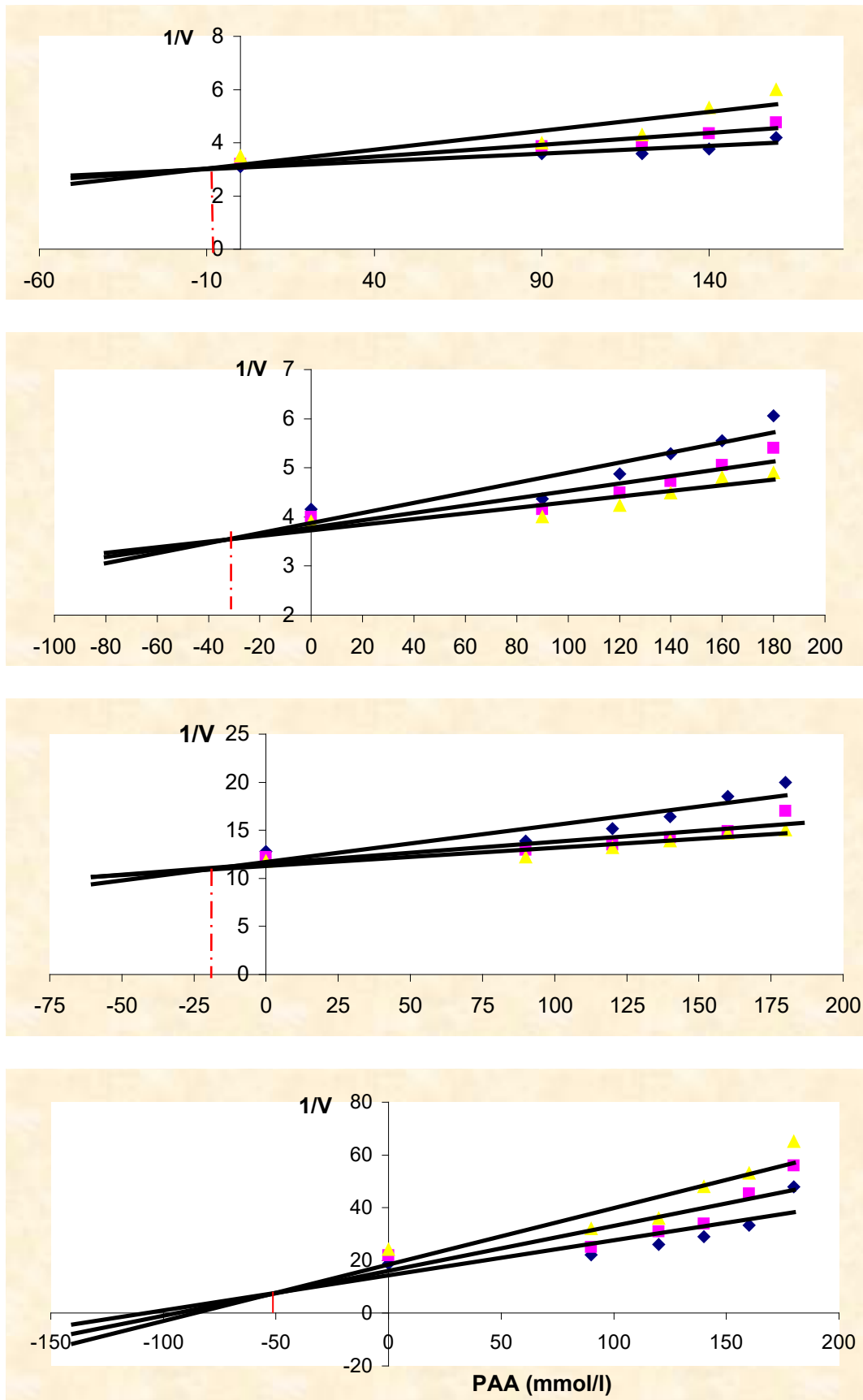
Ryc. 46. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy oraz Mg^{2+} -ATPazy przez PEEA w „cieniach” erytrocytów szczura.



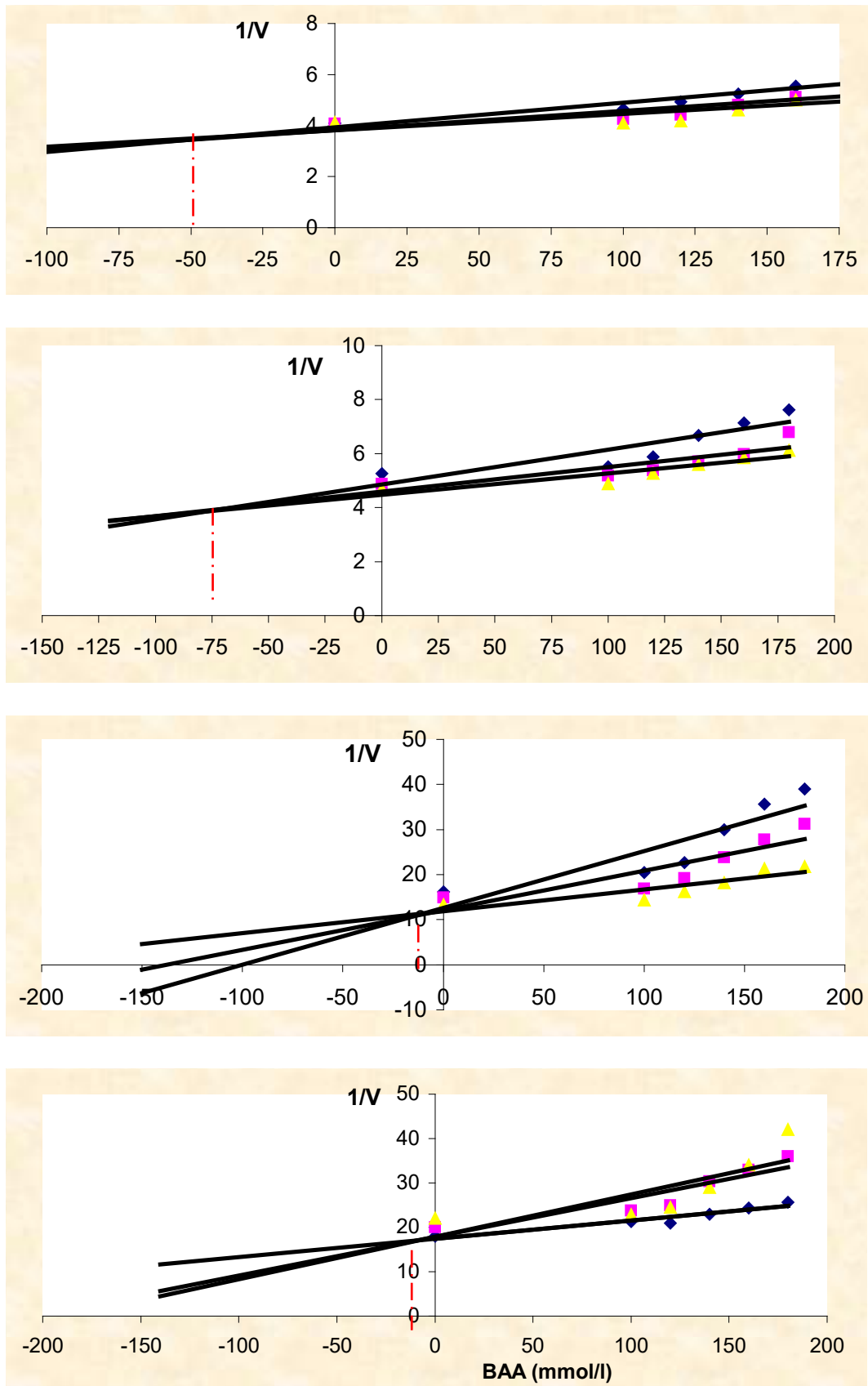
Ryc. 47. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy oraz Mg^{2+} -ATPazy przez MAA w „cieniach” erytrocytów człowieka.



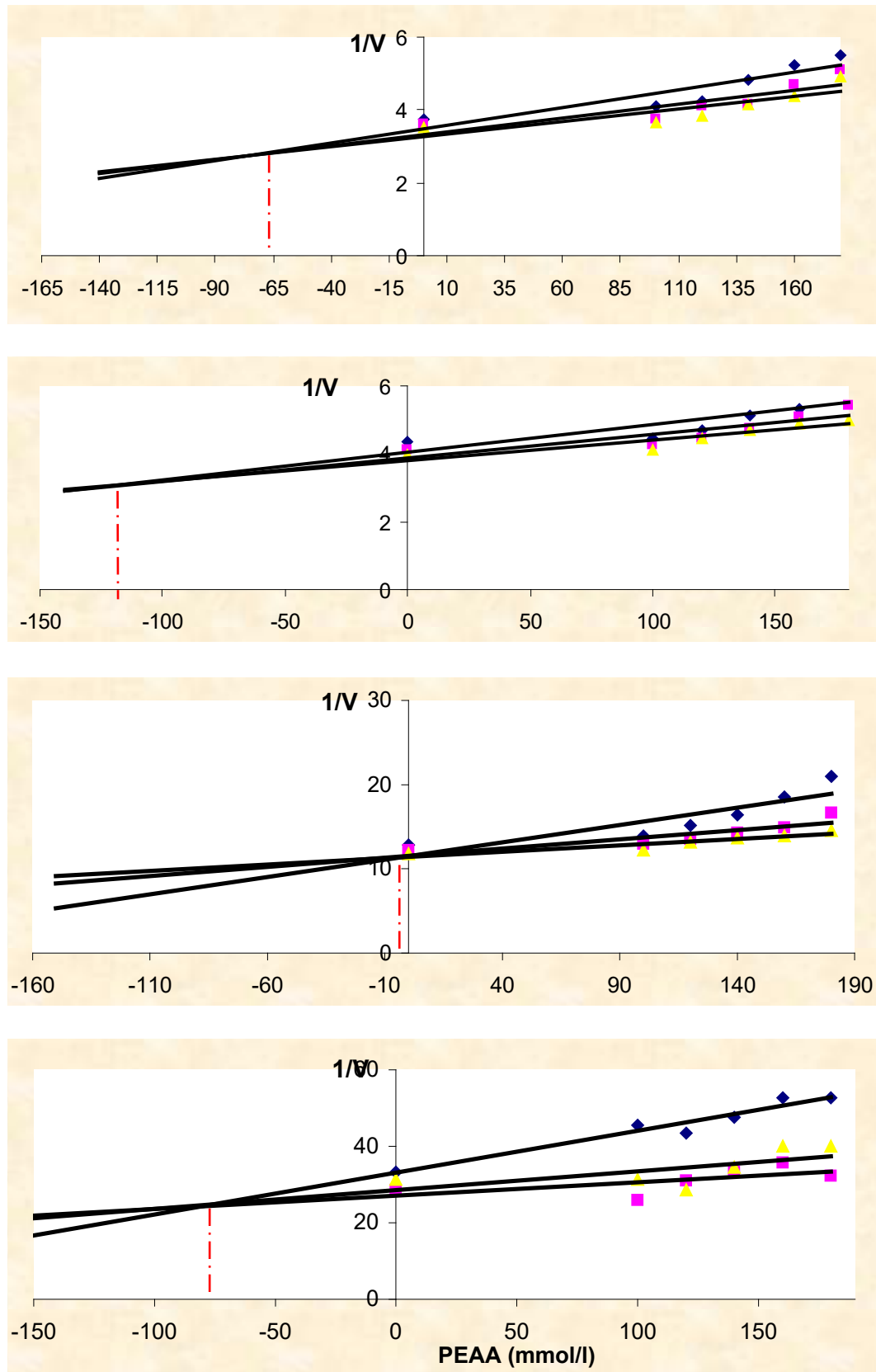
Ryc. 48. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{+2} -ATPazy oraz Mg^{+2} -ATPazy przez EAA w „cieniach” erytrocytów człowieka.



Ryc. 49. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy oraz Mg^{2+} -ATPazy przez PAA w „cieniach” erytrocytów człowieka.



Ryc. 50. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy oraz Mg^{2+} -ATPazy przez BAA w „cieniach” erytrocytów człowieka.



Ryc. 51. Krzywe Dixona dla hamowania $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy, Na^+/K^+ -ATPazy, Ca^{2+} -ATPazy oraz Mg^{2+} -ATPazy przez PEAA w „cieniach” erycytów człowieka.

Tab. 14. Wartości K_i dla ATPazy w cieniach erytrocytów szczura i człowieka.

AAA	Cienie erytrocytów szczura K_i (mmol/l)		
	$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ - ATPazy	Na^+/K^+ -ATPazy	Ca^{2+} -ATPazy
MAA	$0,8 \times 10^2$	$1,03 \times 10^2$	$0,32 \times 10^{-2}$
EAA	$0,68 \times 10^2$	$0,68 \times 10^2$	$0,24 \times 10^{-2}$
PAA	$0,22 \times 10^{-2}$	$0,7 \times 10^2$	$0,22 \times 10^{-2}$
BAA	$0,4 \times 10^{-2}$	$0,24 \times 10^{-2}$	$0,09 \times 10^{-2}$
PEAA	$0,33 \times 10^{-2}$	$0,28 \times 10^{-2}$	$0,01 \times 10^{-2}$
	Cienie erytrocytów człowieka K_i (mmol/l)		
MAA	$1,55 \times 10^2$	$1,76 \times 10^2$	$0,55 \times 10^{-2}$
EAA	$1,25 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$	$0,35 \times 10^{-2}$
PAA	$0,1 \times 10^{-2}$	$0,3 \times 10^{-2}$	$0,18 \times 10^{-2}$
BAA	$0,5 \times 10^{-2}$	$0,75 \times 10^{-2}$	$0,1 \times 10^{-2}$
PEAA	$0,66 \times 10^{-2}$	$1,20 \times 10^{-2}$	$0,01 \times 10^{-2}$

6. Dyskusja

6.1 Hemolityczne działanie EGAE *in vivo* oraz AAA *in vitro*

EGAE stanowią liczną grupę związków chemicznych o szerokim zastosowaniu praktycznym. Pomimo ich strukturalnego podobieństwa toksyczność tych związków jest zróżnicowana. O ile krótkołańcuchowe EGAE, takie jak ME i EE, wywierają działanie gonadotoksyczne, embriotoksyczne i teratogennie (Foster i wsp. 1987, Ghanayem i Chapin 1990, Tyl i wsp., 1984; 1997), o tyle etery długołańcuchowe, tj. IPE i BE działają hemolitycznie (Carpenter i wsp., 1956, Grant i wsp., 1984, Ghanayem i wsp., 2000, Ghanayem i Sullivan, 1993). Za toksyczność tych związków są odpowiedzialne ich metabolity, tj. AAA (Ghanayem i Sullivan, 1993). Tak więc toksyczne działanie EGAE jest wielokierunkowe.

Badania własne potwierdziły zróżnicowane działanie hemolityczne poszczególnych EGAE. Ponadto, pozwoliły określić dynamikę zmian hematologicznych w zależności od dawki eteru i czasu jaki upłynął od jego podania.

Badane etery podawano podskórną w jednorazowych dawkach 2,5 - 10,0 mmol/kg w przypadku ME i EE lub 0,625 – 5,0 mmol/kg IPE lub BE. Po podaniu ME i EE zmiany hematologiczne ujawniły się dopiero po najwyższych dawkach tych związków tj. 10 mmol/kg i były słabo zaznaczone. Natomiast w przypadku IPE i BE działanie hemolityczne obserwowano na każdym poziomie dawkowania. Po najwyższych dawkach tych związków (2,5 i 5,0 mmol/l) zmiany hematologiczne miały dramatyczny przebieg.

Najwcześniej, bo już po 6 godz. po podaniu IPE lub BE, dochodziło do „puchnięcia” erytrocytów, wyrażonego wzrostem Ht i MCV oraz HGB_o. W późniejszym czasie tj. po 24 godz. stężenie HGB_o czyli hemoglobiny osoczowej ulegało normalizacji w wyniku jej wydalania przez nerki, co

zostało potwierdzone wyraźną hemoglobinurią zależną od dawki BE w pierwszej dobie doświadczenia (Starek i Jarosz, 2001). Hemoglobinuria była następstwem fragmentacji błony erytrocytarnej i wewnątrznaczyniowej lizy tych komórek oraz usuwania uszkodzonych krwinek przez układ siateczkowo-śródbłonkowy, głównie śledziony. Przemawia za tym wzrost względnej masy śledziony obserwowany po podaniu BE (Burkhart i Donovan, 1998, Dill i wsp., 1998). Konsekwencją wyraźnej hemolizy był spadek hematokrytu i stężenia hemoglobiny we krwi i w krwinkach (MCHC) (Bartnik i wsp., 1987, Starek i Jarosz, 2001, Starek i wsp., 2002).

Zmiany hematologiczne były najsilniej zaznaczone po 24 godz. od podania badanych związków, co koresponduje z maksymalną wydajnością przemiany EGAE do AAA (Ghanayem i wsp., 1987).

Konsekwencją opisanych zmian hematologicznych była niedokrwistość polichromatyczna, makrocytowa i regeneracyjna manifestująca się wzrostem liczby retikulocytów we krwi obwodowej (Udden, 2000, Starek i Jarosz, 2001). Na przebieg procesów regeneracyjnych w układzie krwiotwórczym w ostrej niedokrwistości hemolitycznej indukowanej eterami glikolu etylenowego wskazują zmiany makroskopowe w śledzionie (hematopoeza pozaszpikowa) i szpiku kostnym w postaci hiperplazji składników erytroidalnych, co manifestowało się obecnością erytroblastów we krwi obwodowej (Breslin i wsp., 1991; Starek i wsp., 2006).

Większość zmian hematologicznych po jednorazowym podaniu IPE była odwracalna dopiero po 25 dniach po jego podaniu, chociaż wzrost MCV utrzymywał się dłużej, prawdopodobnie z powodu wybiórczej hemolizy erytrocytów starszych na co wskazywali Carpenter i wsp. (1956) i pojawienia się populacji młodych krwinek. Dodatkowo młode krwinki produkowane w czasie remisji zawierały więcej hemoglobiny, stad utrzymujący się w czasie wzrost wartości MCH (Grant i wsp., 1985).

Wyniki badań własnych znajdują potwierdzenie w badaniach Ghanayema i wsp. (2001), którzy podawali szczurom BE dożołądkowo w

jednorazowej dawce 250 mg/kg (2 mmol/kg). W 4 godz. po podaniu tego związku oprócz zmian hematologicznych w postaci redukcji RBC, spadku Ht i HGB oraz wzrostu MCV i MCH obserwowali również wzrost liczby płytek krwi. Znaczny wzrost liczby tych komórek zbiega się w czasie z maksymalnymi zmianami pozostałych wskaźników hematologicznych między 4-24 godz. po podaniu BE. Liza krwinek powoduje uwalnianie czynników krzepnięcia oraz wzrost tendencji erytrocytów do rulonizacji i agregacji. Zasugerowano, że zjawisko to prowadzi do powstawania wtórnych zmian patologicznych pod postacią zakrzepicy w takich narządach jak płuca, wątroba, serce, narząd wzroku i układ kostny (Ezov i wsp., 2002).

Zmiany hematologiczne obserwowane w badaniach własnych *in vivo* u szczurów samców są potwierdzeniem tezy Nitter-Hauge (1970), iż utlenianie EGAE do AAA w przypadku BE jest odpowiedzialne za te zmiany. Natomiast ME i EE, obok utleniania do AAA, są częściowo metabolizowane do glikolu etylenowego. Ponadto, szybkość metabolizmu tych ostatnich związków jest mniejsza od szybkości utleniania IPE i BE do odpowiednich AAA. Dlatego u szczurów którym podano ME lub EE nie obserwowano zmian hematologicznych, które występowały po podaniu IPE lub BE.

Przeprowadzone badania wyraźnie różnicują EGAE pod względem siły hemolitycznego działania *in vivo*. Zgodnie z oczekiwaniami BE wywierał najsilniejsze działanie hemolityczne u szczurów. Był on odpowiednio 8- i 4-krotnie silniejszym czynnikiem hemolitycznym w porównaniu z ME i EE i nieistotnie aktywny od IPE. Pozwala to na uszeregowanie badanych eterów w kolejności rosnącej aktywności hemolitycznej ME<EE<IPE=BE (Starek i wsp., 2002, Starek i wsp., 2004).

Wyniki badań własnych wskazują, że siła hemolitycznego działania EGAE zależy od wielkości cząsteczek tych związków wyrażonej m. in. masą cząsteczkową. Masa cząsteczkowa rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego w grupie alkoksylowej. Ponieważ wzrost długości łańcucha alkilowego EGAE prowadzi do wzrostu lipofilowości tych

związków, dlatego można sugerować, że siła hemolitycznego działania EGAE *in vivo* koreluje dodatnio z ich lipofilowością (Starek i wsp., 2002).

Istnieje możliwość przeciwdziałaniu hemolitycznemu działaniu EGAE *in vivo*. Polega to na hamowaniu procesu utleniania EGAE do AAA przez inhibitory ADH lub ALDH, co powoduje uruchomienie alternatywnej drogi metabolicznej tj. sprzęgania związków macierzystych z kwasem glikuronowym i siarkowym, a następnie wydalanie powstałych koniugatów przez nerki (Ghanayem i wsp., 1987; Medinsky i wsp., 1990).

W niniejszej pracy oceniono ochronne działanie etanolu, metylopirazolu i pirazolu, jako czynników hamujących pierwszą fazę utleniania EGAE w ostrym zatruciu BE, jako substancją modelową.

Uzyskane wyniki potwierdziły rolę aktywacji metabolicznej BE w hematotoksyczności tego związku na co wskazywali również inni autorzy (Carpenter i wsp., 1956; Ghanayem, 1989; Ghanayem i Sullivan, 1993).

Alkohole alifatyczne jednohydroksylowe są substratami ADH konkurencyjnymi względem EGAE, a ich powinowactwo do enzymu jest znacznie wyższe niż badanych eterów (Romer i wsp., 1985).

W doświadczeniu przeprowadzonym na szczurach jedynie dwukrotne podanie etanolu *per os* 15 min przed i 3 godz. po podskórnym wstrzyknięciu BE w dawce 1,25 mmol/kg chroniło erytrocyty przed hemolizą. Jednorazowe podanie etanolu 15 min. przed wstrzyknięciem BE nie było już tak skuteczne i powodowało tylko częściową ochronę krwinek. W pierwszym modelu doświadczenia, bezpośrednie działanie etanolu na ADH nakładało się na maksymalną przemianę BE do BAA, która następuje po 10-30 min. po podaniu tego związku (Corley i wsp., 1994; 2005).

Również MP i PY jako inhibitory ADH wykazywały wyraźny efekt ochronny u szczurów, którym podano BE drogą podskórną. Działanie protekcyjne obu inhibitorów zależało od ich dawki. MP i PY w zakresie dawek 0.09 – 0.36 mmol/kg, podane równocześnie z BE, całkowicie znosiły jego hemolityczne działanie. Hemoliza pojawiła się dopiero po podaniu MP

lub PY w najniższych dawkach tj. 0,045 mmol/kg. W przypadku podania tych związków dwie godziny po wstrzyknięciu BE nie obserwowano ich ochronnego działania ponieważ już wcześniej doszło do utlenienia BE do BAA (Starek i wsp., 2007). Można przypuszczać, że szybkość blokowania ADH przez MP i PY jest podobna do szybkości przemiany BE do BAA. Wydaje się to wskazywać na podobną szybkość osiągnięcia centrum katalitycznego enzymu przez substrat i inhibitory.

Tak więc brak protekcji w zastosowanym modelu doświadczenia jest związany z toksykokinetyką BE. Związek ten bowiem, podobnie jak pozostałe EGAE, jest szybko metabolizowany do BAA, który osiąga maksymalne stężenie we krwi obwodowej już po 10 – 30 min po jego dożylnym lub dootrzewnowym podaniu (Corley i wsp., 1994; 2005). Potwierdzają to również wyniki badań Ghanayema i wsp. (1987) nad rolą cyjanamidu (inhibitora ALDH) w metabolizmie BE u szczurów. Po iniekcji cyjanamidu w dawce 50 mg/kg pół godziny przed podaniem BE *per os* w dawce 500 mg/kg nie obserwowano działania ochronnego, a stopień hemolizy i innych zmian toksycznych był tak duży, że prowadził do śmierci zwierząt.

Na celowość stosowania inhibitorów ADH w leczeniu ostrych zatruc BE wskazali Burkhat i wsp. (1998) na przykładzie 19-letniego mężczyzny, u którego w trakcie leczenia początkowej fazy zatrucia tym związkiem, zastosowano tylko hemodializę. W konsekwencji doszło do poważnych zmian neurologicznych, obserwowanych po przebytych zatruciu.

Uzyskane dane pokazują, iż MP i PY mogą zmniejszać metaboliczne konsekwencje zatrucia BE wyrażone kwasicą metaboliczną i hemolizą. Ponadto, związki te podane odpowiednio wcześniej, mogą mieć terapeutyczne znaczenie w czasie przebiegu ostrego zatrucia BE lub innymi EGAE. Sugestia ta jest zgodna z danymi, które wskazują, że MP jest skutecznym inhibitorem kompetycyjnym ADH, zwłaszcza ADH-1 i ADH-2 w wątrobie szczurów oraz ADH-1, ADH-3 i ADH-4 w skórze tych zwierząt (Lockley i wsp., 2005).

Należy nadmienić, że podanie MP skojarzone z hemodializą jest potwierdzonym, bezpiecznym postępowaniem ratowniczo-leczniczym, stosowanym w ostrych zatruciach glikolem etylenowym i metanolem (Girault i wsp., 1999; Aakervik i wsp., 2002).

Model leczenia ostrego zatrucia EGAE z zastosowaniem MP lub PY jest obecnie częściej stosowany, niż podawanie etanolu jako odtrutki, również ze względu na jego toksyczne działanie na ośrodkowy układ nerwowy. Ponadto, metabolizm etanolu jest związany z generowaniem reaktywnych form tlenu (ROS), które mogą wywoływać wieloukładowe zmiany toksyczne w organizmie. Dlatego terapia etanolowa wymaga monitorowania stężenia tego związku w surowicy pacjenta na co zwracają uwagę liczni autorzy (Brent, 2001; Paez i wsp., 2004).

Podsumowując, można stwierdzić, że zahamowanie przemiany BE do BAA za pomocą etanolu, MP lub PY chroni erytrocyty przed hemolizą. Fakt ten można z powodzeniem wykorzystywać w toksykologii klinicznej w celu ratowania lub leczenia ludzi zatrutych IPE lub BE. Związki te bowiem wywierają silne działanie hemolityczne oraz powodują ciężką kwasicę metaboliczną.

Wyniki badań nad hemolitycznym działaniem EGAE *in vivo* znalazły potwierdzenie w badaniach *in vitro*. W badaniach tych wykazano, że AAA, będące metabolitami EGAE, bezpośrednio działają hemolitycznie na erytrocyty szczura i człowieka. Same EGAE nie działają hemolitycznie na krwinki szczura (Ghanayem, 1989). Ghaneyem (1989) wykazał, że w czasie inkubacji erytrocytów szczura z BE w zakresie stężeń 5-20 mmol/l hemoliza pojawiła się tylko przy najwyższym stężeniu tego związku (20 mmol/l). Niższe stężenia powodowały jedynie niewielki wzrost Ht. Stopień nasilenia zmian w erytrocytach nie korelował ze stężeniem BE ani czasem narażenia, a sama hemoliza była niespecyficzną odpowiedzią krwinek na działanie badanego eteru. Ponadto, w czasie inkubacji erytrocytów szczura z BE nie obserwowano „puchnięcia” krwinek.

W badaniach własnych działanie hemolityczne AAA manifestowało się redukcją RBC i Ht oraz wzrostem MCV.

Poszczególne AAA różniły się siłą hemolitycznego działania wyrażoną wartościami stężeń efektywnych EC_{50} . Wartości tego parametru malały wraz ze wzrostem lipofilowości (Log P) i spadkiem kwasowości (pKa) badanych AAA. Wartości Log P dla MAA, EAA, PAA, BAA i PEAA wynosiły odpowiednio -0,91, -0,27, 0,18, 0,67 i 1,15, podczas gdy pKa tych kwasów stopniowo rosły osiągając wartości wynoszące odpowiednio 3,46, 3,52, 3,98, 3,93, 4,0 (Genium's, 1999).

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że siła działania hemolitycznego AAA rośnie wraz ze wzrostem lipofilowości i spadkiem kwasowości tych związków, co znalazło odzwierciedlenie w ujemnych korelacjach liniowych pomiędzy EC_{50} i Log P lub pKa zwłaszcza w przypadku erytrocytów szczura. Jest to uzasadnione faktem łatwiejszego pokonywania lipoproteinowych błon komórkowych przez ksenobiotyki wraz ze wzrostem ich lipofilowości i zasadowości.

Zgodnie z hipotezą podziału wg pH spadek kwasowości w przypadku słabych elektrolitów do których należą AAA, zwiększa udział niezdysocjowanych cząsteczek tych kwasów w procesie ich przechodzenia przez błonę erytrocytarną, co może skutkować wzrostem zaburzeń błonowych i w konsekwencji hemolizą krwinek. Wydaje się, że hipoteza ta znajduje częściowe potwierdzenia w wynikach badań Uddena i Pattona (2005), którzy stwierdzili trwałe zmiany wartości MCV w erytrocytach szczura poddanych działaniu BAA pomimo usunięcia tego związku z medium hodowlanego na drodze wymywania. W konkluzji można stwierdzić, że wyniki badań nad siłą hemolitycznego działania AAA *in vitro* potwierdzają różnice tego działania EGAE *in vivo*. Tak więc wyniki badań nad hemolitycznym działaniem EGAE *in vivo* i AAA *in vitro* wydają się być spójne.

Wyniki badań własnych *in vitro* pod względem jakościowym są na ogół zbieżne z danymi Ghanayem'a i wsp. (1989), którzy stwierdzili zależność

między siłą hemolitycznego działania AAA *in vitro* na erythrocyty szczura a strukturą tych związków. Zgodnie z danymi cytowanych Autorów lista rankingowa AAA według malejącej siły działania hemolitycznego jest następująca: BAA>PAA≥PEAA>EAA>MAA. Interesującym spostrzeżeniem cytowanych Autorów jest to, że stężenie BAA znakowanego ¹⁴C pozostawało stosunkowo stałe w osoczu krwi, natomiast rosło w erythrocytach w funkcji czasu. Wzrost ten przebiegał równolegle ze wzrostem MCV. Inkubacja erythrocytów szczura z BAA przez 30 min., a następnie usunięcie tego kwasu przez dwukrotne przemycie erythrocytów i dalszą inkubację otrzymanych krwinek nie zmniejszało stopnia puchnięcia erythrocytów.

Ponadto, wrażliwość erythrocytów na EGAE *in vivo* oraz na AAA *in vitro* wykazuje różnice gatunkowe (Ghanayem i Sullivan, 1993, Udden i Patton, 1994). Wykazano bowiem, że erythrocyty szczurów, myszy, chomików, królików i pawianów są bardziej wrażliwe na hemolityczne działanie BAA niż krwinek pochodzących od świnek morskich, psów, kotów, a także człowieka (Ghanayem i Sullivan, 1993). Zagadnienie to było tylko częściowo przedmiotem badań w niniejszej pracy ponieważ obejmowała jedynie dwa gatunki.

Udden (2002) badając wrażliwość erythrocytów ludzkich na BAA *in vitro* stwierdził, że jest ona około 100-krotnie mniejsza w porównaniu z erythrocytami szczura. Natomiast w badaniach własnych wykazano, że erythrocyty ludzkie są około 10-krotnie mniej podatne na hemolizę od erythrocytów szczura. Rozbieżność ta wynika z różnic warunków w jakich prowadzono doświadczenia oraz rodzaju i czułości zastosowanych wskaźników określających hemolityczne działanie BAA. Udden badał 10% zawiesinę erythrocytów, natomiast we własnych badaniach stosowano zawiesinę 20%. Kryteriami hemolitycznego działania jakie przyjął Udden były: stopień odkształcania (ang. deformability) erythrocytów, MCV i oporność osmotyczna krwinek oraz zmiany elektrolitowe w krwinkach. Ponadto autor ten oceniał subhemolityczne działanie BAA stosując bardzo

niskie stężenia tego związku. W badaniach własnych oceniono działanie hemolityczne na podstawie zmianach liczby RBC, Ht i MCV w zakresie stężeń AAA działających hemolitycznie.

Stosunkowo mała wrażliwość erytrocytów ludzkich na BAA, nie przesądza o braku ryzyka wystąpienia niedokrwistości hemolitycznej u zdrowych osób narażonych na działanie BE. Świadczy o tym kazuistyka zatruć tym eterem (Rambourg – Schepens i wsp., 1988; Gijzenbergh i wsp., 1989; Litovitz i wsp., 1990; Bauer i wsp., 1992). Ponadto istnieją osoby, u których ryzyko wystąpienia niedokrwistości hemolitycznej jest większe niż w populacji generalnej. Są to osobnicy z takimi zaburzeniami, jak dziedziczna sferocytoza, niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i niedokrwistość sierpowata. Do grupy podwyższonego ryzyka niedokrwistości hemolitycznej można zaliczyć również osoby starsze. Wykazano bowiem, że erytrocyty starsze są bardziej podatne na hemolizę niż erytrocyty młodsze (Ghanayem i wsp., 1987; 1990). Uważa się, że przyczyną tego zjawiska są różnice biochemiczne i biofizyczne wynikające z wieku erytrocytów. Erytrocyty starsze cechują się niższą aktywnością takich enzymów jak heksokinaza, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, dyzmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, transferaza glutationowa i katalaza, niższym stężeniem GSH, ATP, 2,3-difosfoglicerynianu oraz wyższym stężeniem produktów peroksydacji lipidów, takich jak dialdehyd malonowy i nadtlenki lipidowe (Detraglia i wsp., 1974, Kaneko, 1974, Abraham i wsp., 1978; Glass i Gershon, 1984; Yargicoglu i wsp., 2001). Ponadto wraz z wiekiem wzrasta łamliwość i spada oporność osmotyczna krwinek (Shiga i wsp., 1979).

Możliwe, że istniejące różnice biochemiczne oraz różnice szybkości transportu jonów przez błonę komórkową pomiędzy erytrocytami szczura i człowieka mogą być częściowym wyjaśnieniem różnic wrażliwości tych komórek na hemolityczne działanie AAA.

Wykazano również różnice w wykrzepianiu wewnątrznaczyniowym pod wpływem BE, zależne od wieku. Stwierdzono mniejszą wrażliwość szczurów 6 tyg. w porównaniu ze szczurami 12 tyg. (Ramot i wsp., 2007).

Potwierdzeniem zależności pomiędzy wrażliwością erytrocytów i ich wiekiem są wyniki doświadczeń *in vivo* Ghanayem'a i wsp. (1987; 1990), którzy podawali szczurom starszym (9-13 tygodni) i młodszym (4-5 tygodni) BE w dawce 250 mg/kg. U szczurów starszych obserwowali bardziej nasiloną hemolizę niż u szczurów młodszych. Autorzy ci stwierdzili, że zjawisko to nie było spowodowane różnicami toksykokinetycznymi BE, zależnymi od wieku.

Jak wyżej nadmieniono, aktywność hemolityczna EGEA *in vivo* oraz AAA *in vitro* jest ściśle związana z budową chemiczną i właściwościami fizyko-chemicznymi badanych substancji. Chociaż badane związki różnią się pomiędzy sobą jedynie długością łańcucha alkilowego, to różnica ta ma istotny wpływ na takie parametry fizyko-chemiczne, jak lipofilowość wyrażona wartościami Log P oraz kwasowość, której miarą są wartości pKa. Wiadomo, że długość łańcucha alkilowego lub ugrupowań alkilowych w cząsteczkach różnych związków zwiększa lipofilowość, natomiast w przypadku kwasów karboksylowych wyraźnie osłabia kwasowość.

Istniejące różnice we właściwościach fizyko-chemicznych ksenobiotyków mają istotny wpływ na ich toksyczność. Pozwala to na konstruowanie ilościowych zależności pomiędzy strukturą i aktywnością w wymiarze jakościowym (SAR) lub ilościowym (QSAR). Jest to przykład komputerowego modelowania toksyczności, która ma istotne znaczenie w przewidywaniu toksyczności nowych związków na zasadzie podobieństwa do znanych ksenobiotyków (Gerner i Schleder, 2002).

Do analizy QSAR brane są pod uwagę zarówno substancje o szerokim spektrum działania toksycznego i różnorodnej budowie chemicznej jak i substancje podobne strukturalnie, o podobnym mechanizmie działania, a nie

koniecznie o podobnej budowie chemicznej (Barratt i wsp., 1995; Cronin, 2002).

W komputerowym modelowaniu toksyczności stosunkowo dużą trudność sprawiają substancje o podobnej budowie i podobnych właściwościach fizyko-chemicznych, które wykazują różne mechanizmy działania. Dlatego próby wprowadzenia analiz QSAR do toksykologii nie zakończyły się pełnym sukcesem (Worth i Balls, 2002).

Dla potrzeb notyfikacji nowych substancji chemicznych, w ostatnich latach rozwinął się kierunek tzw. wnioskowania „read-across” o toksyczności danego związku na podstawie podobieństwa cech strukturalnych i fizyko-chemicznych do grupy związków o znanej toksyczności. Znając toksyczność wielu substancji danego szeregu homologicznego można z dużym prawdopodobieństwem określić toksyczność substancji występującej w dowolnym miejscu tego szeregu (Combes i wsp., 2003, Knight i Breheny, 2002).

W badaniach własnych podjęto próbę analizy zależności pomiędzy wartościami EC_{50} AAA i ich wartościami Log P i pKa. Stwierdzono wyraźnie ujemne korelacje liniowe wskazując, że siła działania hemolitycznego tych związków rośnie z lipofilowością i spadkiem kwasowości. Obserwacja ta jest spójna z hipotezą podziału wg pH oraz prawami dyfuzji biernej.

6.2 Mechanizmy hemolitycznego działania EGAE

Izolację erytrocytów szczurzych lub ludzkich z krwi pełnej przeprowadzono metodą kolumnową wg Beutler’a, zaś cienie erytrocytów szczura i człowieka preparowano metodą Dick’a. Uzyskane cienie erytrocytarne stosowano do oceny wpływu AAA na aktywność ATPaz *in vitro*.

Pomimo sugestii, że hemolityczne działanie EGAE *in vivo* lub AAA *in vitro* może być związane z hamowaniem aktywności ATPaz (Udden, 2002) w dostępnym piśmiennictwie nie ma empirycznych danych na ten temat.

Wiadomo, że transport jonów przez błony erythrocytarne jest procesem wymagającym udziału energii dostarczanej z rozpadu ATP. Dlatego należałoby się spodziewać, że zahamowanie aktywności ATPaz przez AAA spowoduje wzrost poziomu ATP w krwinkach. Sugestia ta nie znalazła potwierdzenia w badaniach Ghanayem'a (1989), który obserwował spadek poziomu ATP w erythrocytach w wyniku działania BAA oraz ochronę erythrocytów przed hemolizą przez ten nukleotyd pochodzenia egzogenego. Z drugiej strony, spadek poziomu ATP może być związany z wyciekaniem Mg^{2+} z krwinki, co ujemnie wpływa na proces glikolizy (Ghanayem i wsp., 1992).

Ponadto, jednym ze wskaźników efektywności działania pomp błonowych jest transport jonów przez błonę komórkową i utrzymywanie równowagi jonowej komórki. Stąd zbyt niski poziom ATP w krwinkach powoduje obniżenie aktywności Na^+/K^+ -ATPazy czego wynikiem może być wzrost stężenia sodu i wody w erythrocycie.

W badaniach własnych wykazano różnice aktywności wszystkich trzech ATPaz tj. $Na^+/K^+/Mg^{2+}$ -ATPazy (ATPaza całkowita), Ca^{2+} -ATPazy i Na^+/K^+ -ATPazy w cieniach erythrocytów szczura i człowieka. Aktywność $Na^+/K^+/Mg^{2+}$ -ATPazy była wyższa od Na^+/K^+ -ATPazy, a ta wyższa od Ca^{2+} -ATPazy. Wyniki te znajdują potwierdzenie w danych z piśmiennictwa (Yucebilgic i wsp., 2003). Aktywności ATPaz w cieniach erythrocytów szczura była wyraźnie wyższa od aktywności tych enzymów w cieniach erythrocytów człowieka.

ATPazy w cieniach erythrocytów ludzkich były wyraźnie mniej podatne na inhibicyjne działanie AAA w porównaniu z ATPazami w erythrocytach szczurzych.

Podsumowując, można stwierdzić, że zastosowane metody badawcze pozwoliły na wykazanie zależności pomiędzy hamującym działaniem AAA a

rodzajem ATPazy. Ca^{2+} -ATPaza i Na^+/K^+ -ATPaza okazały się bardziej wrażliwe na inhibicyjne działanie AAA niż Mg^{2+} -ATPaza. Być może jest to związane z chelatującym działaniem AAA na jony Ca^{2+} i Mg^{2+} , które aktywują te enzymy. Działanie to jest wielokrotnie silniejsze w przypadku jonów Ca^{2+} niż Mg^{2+} , co wykazano w badaniach *in vitro* (Starek i Nowak, 2006).

Dotychczas nie określono mechanizmu(ów) hemolitycznego działania EGAE.

Udden (2002) wykazał, że w czasie inkubacji erytrocytów szczura lub erytrocytów człowieka z BAA następuje wzrost stężenia Na^+ w krwinkach. W tych warunkach komórka transportuje K^+ na zewnątrz oraz pobiera wodę, aby ponownie doprowadzić do stanu równowagi jonowej. Dlatego dochodzi do „puchnięcia” krwinki, a następnie jej lizy. Na podstawie tych obserwacji Autor zasugerował możliwość zmian aktywności ATPaz błonowych, co może zaburzać transport wody i elektrolitów do komórki oraz homeostazę jonową.

Ponadto, we wcześniejszych pracach wykazano, że BAA powoduje spadek poziomu ATP w erytrocytach przy braku zmian aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i stężenia zredukowanego glutationu. Dodatek egzogenego ATP przeciwdziała hemolizie *in vitro* (Ghanayem, 1989). Jednak nie wiadomo czy spadek ATP jest pierwotnym czy wtórnym efektem działania BAA. Sugeruje się, że spadek poziomu tego nukleotydu może być wynikiem dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich ma polegać na upośledzeniu syntezy ATP. Jeśli ta hipoteza jest prawdziwa to oznaczałoby, że „puchnięcie” krwinek jest efektem wtórnym względem deficytu energetycznego komórki. Drugi z mechanizmów może polegać na interakcji BAA z błoną erytrocytarną, a zwłaszcza z ATPazami, której konsekwencją jest zaburzenie równowagi osmotycznej komórki. W tym przypadku całość endogenego ATP jest wykorzystywana do utrzymania integralności błony komórkowej i homeostazy elektrolitowej.

Udden i Patton (2005) przeprowadzili szereg doświadczeń, podczas których badali mechanizmy hemolitycznego działania BAA w obecności różnych związków. W celu określenia wpływu BAA na błonę erytrocytarną Autorzy inkubowali erytrocyty szczura z BAA o niskim stężeniu w obecności sacharozy, która powodowała obniżenie MCV krwinek i chroniła je przed hemolizą. Z kolei inkubacja erytrocytów szczura z sacharozą i BAA o wysokim stężeniu, a następnie usunięcie BAA z buforu nie przeciwdziało hemolizie. Wyniki tego doświadczenia wskazują, że ochronne działanie sacharozy nie było związane z jej hamującym działaniem na BAA. Kwas ten zwiększał przepuszczalność błony komórkowej co prowadziło do „puchnięcia” krwinek.

Zbadano również wpływ Na^+ i K^+ na powstawanie sferocytów w czasie inkubacji erytrocytów szczura z BAA. W badaniach tych zastąpienie sodu przez potas spowodowało 70-80% redukcję hemolizy erytrocytów w obecności BAA. Również wartość MCV była większa, gdy krwinki były inkubowane w medium zawierającym BAA (1,0-2,0 mmol/l) oraz wysokie stężenie Na^+ i niskie stężenie K^+ . Wydaje się, że potwierdza to wcześniejsze badania Udden'a (2002) o wpływie BAA na przechodzenie sodu do wnętrza komórki.

Oceniono również wpływ jonów wapnia i magnezu na hemolizę krwinek indukowaną przez BAA o stężeniu 2,0 mmol/l *in vitro*. Wapń wyraźnie zmniejszał hemolizę erytrocytów, a jego chelatowanie za pomocą EGTA nasilało hemolizę.

O ile wapń chronił erytrocyty przed hemolizą o tyle magnez nie wywierał żadnego działania ochronnego. Potwierdzeniem tego jest doświadczenie Udden'a (1998), w którym magnez nie zmniejszał hemolizy erytrocytów szczura w obecności BAA *in vitro*. Wydaje się, że wyniki badań własnych w których nie obserwowano wyraźnego hamującego działania AAA na aktywność Mg^{2+} -ATPazy są spójne z danymi cytowanej pracy.

Istnieją przypuszczenia, że erytrocyty w obecności wapnia powoli zwiększają swoją objętość ponieważ wapń pozwala na rozpoczęcie kompensacyjnego ruchu kationów przez błonę komórkową, co hamuje hemolizę. Uważa się, że przy braku wapnia w medium inkubacyjnym krwinki szybko „puchną” i pękają (O’Rear i wsp, 1982, Noji i wsp., 1987).

Wapń może hamować działanie BAA bezpośrednio tzn. przez jego kompleksownie lub przez utworzenie połączenia w miejscu reakcji na błonie komórkowej. Istnieje hipoteza, że opóźnienie hemolizy przez wapń związane jest z aktywacją kanału Gardosa. Jest to kanał potasowy, aktywowany przez wapń dostający się do wnętrza komórki (Gardos, 1958). Kanał ten jest specyficznym hamowany przez charybdotoksynę, składnik jadu skorpiona (Wolff i wsp., 2001). W przeprowadzonym doświadczeniu tylko 5% erytrocytów uległo hemolizie podczas ich inkubacji z BAA w obecności wapnia. Hemolityczne działanie BAA na erytrocyty szczura zawieszony w buforze zawierającym wapń była wyraźnie nasilone w obecności charybdotoksyny. Dodanie charybdotoksyny do medium inkubacyjnego spowodowało taki stopień hemolizy jak w czasie inkubacji erytrocytów szczura z BAA bez dodatku wapnia lub w obecności wapnia i EGTA. Świadczy to, że wapń opóźnia hemolizę krwinek przez wpływ na zawartość kationów w ich wnętrzu, co jest mediowane przez kanał Gardosa (Udden i Patton, 2005).

Jednak efekt ochronny wapnia jest procesem bardziej złożonym. Udden (1998) zaobserwował, że w czasie inkubacji erytrocytów szczura z BAA w obecności wapnia następuje spadek hemolizy z 60 do 5%. Z drugiej strony inkubacja erytrocytów szczura z BAA w obecności Ca^{2+} oraz chininy, blokera kanału potasowego, hamowała hemolizę o 90%.

Jak widać, wapń wywiera jedynie przejściowe działanie ochronne, a oprócz kanału Gardosa również inne kanały jonowe biorą udział w ochronie krwinek przed hemolizą indukowaną przez BAA.

Spostrzeżenia na temat zaburzeń homeostazy wapniowej pod wpływem AAA wydają się być spójne z wynikami badań Hobsona i wsp. (1986). Cytowani Autorzy obserwowali zwiększone dobowe wydalanie wapnia z moczem u świnek morskich podprzewlekle narażonych na ME.

Z drugiej strony przeładowanie wapniem komórek innych niż erytrocyty powoduje uszkodzenie mitochondriów, zahamowanie oksydacyjnej fosforylacji i spadek syntezy ATP w wyniku aktywacji enzymów katabolicznych takich jak proteazy lub fosfolipazy, które mogą uszkadzać białka cytoszkieletu komórki (Orrenius i Nicotera, 1987). Mając na uwadze te dane Ghanayem i Chapin (1990; 1996) podjęli próbę oceny wpływu tzw. blokerów kanałów wapniowych na toksyczność ME i BE. Autorzy Ci udowodnili, że werapamil i diltiazem, blokery kanałów wapniowych, osłabiają działanie toksyczne ME i BE. Mechanizm działania protekcyjnego wymienionych leków nie został do końca poznany.

Blokery kanałów wapniowych hamują nadmierny wzrost stężenia jonów wapnia w cytozolu przez ograniczenie jego wchłaniania do komórki lub przez przeciwdziałanie mobilizacji wapnia z mitochondriów i siateczki sarkoplazmatycznej (Hesketh, 1985, Needlemani wsp., 1985). Leki te mogą utrzymywać wysokie poziomy makrofosforanów w komórce oraz mogą zapobiegać nadmiernej aktywacji enzymów proteolitycznych i fosfolitycznych, które powodują uszkodzenie komórki (Orrenius i Nicotera, 1987).

Alternatywnie ochronne działanie blokerów kanałów wapniowych może być związane z hamowaniem fosfodiesterazy cAMP, interakcją z kalmoduliną i białkami kurczliwymi, bezpośrednią ochroną mitochondriów, zahamowaniem Na^+/K^+ -ATPazy i bezpośrednim działaniem na błony komórkowe. Sugerowano również hamujący wpływ werapamilu i diltiazemu na metabolizm BE (Andersson, 1986, Schwarz i wsp., 1981).

Ponadto, należy pamiętać, że wzrost stężenia wapnia w komórce powoduje przemieszczenie fosfatydyloseryny z wewnętrznej warstwy błony

fofolipidowej do warstwy zewnętrznej. Podczas inkubacji erytrocytów szczura z BAA w obecności wapnia dochodziło do eksternalizacji fosfatydyloseryny (Schroit i wsp., 1985). Następstwem tego zjawiska był wzrost adherencji erytrocytów do komórek śródbłonka naczyniowego. Zjawisko to ułatwia rozpoznawanie erytrocytów przez makrofagi. Dlatego rozpad uszkodzonych krwinek *in vivo* w wątrobie lub śledzionie może następować po rozpoznaniu fosfatydyloseryny przez makrofagi krwi obwodowej (Schroit i wsp., 1984). Potwierdzeniem tego są badania Kashkaryev'a i wsp. (2003), którzy wykazali, że erytrocyty szczura narażonego na BE ulegają łatwiej adherencji do komórek śródbłonka naczyniowego niż erytrocyty szczura z nie narażonej grupy kontrolnej.

Badania nad mechanizmami hemolitycznego działania EGAE pozostają nadal otwarte. Wydaje się, że badania *in vitro* nad hamującym działaniem AAA na pompy jonowe (ATPazy), potwierdziły zakładaną hipotezę o negatywnym wpływie AAA na homeostazę jonową erytrocytów. Zahamowanie aktywności ATPaz w błonach erytrocytów zaburza równowagę jonową prowadząc do napływu jonów sodu i wapnia oraz wody do wnętrza komórki oraz utraty jonów potasu i magnezu, co prowadzi do „puchnięcia” krwinek i destrukcji błon erytrocytarnych przez enzymy aktywowane jonami wapnia i w konsekwencji do lizy krwinek.

W badaniach własnych wykazano, że AAA działają hamująco na aktywność komercyjnej Na^+/K^+ -ATPazy wyizolowanej z synaptosomów mózgu świni. Hamowanie to miało charakter komopetycyjny, a jego stopień malał wraz ze wzrostem lipofilowości i spadkiem kwasowości AAA. Również aktywność ATPaz w „cieniach” erytrocytów szczura i człowieka były hamowane w identyczny sposób przez AAA.

Wyniki te są rozbieżne w stosunku do omówionych wcześniej zależności pomiędzy siłą hemolitycznego działania EGAE *in vivo* i AAA *in vitro* i ich wartościami Log P i pKa. Nie ma zatem bezpośredniego związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy zahamowaniem aktywności ATPaz

błonowych i działaniem hemolitycznym badanych związków. Rozbieżność ta wskazuje na możliwość istnienia innych, bliżej nie określonych, mechanizmów odpowiedzialnych za działanie hemolityczne badanych ksenobiotyków.

Istniejąca odwrotna zależność pomiędzy wartościami pKa kwasów alkoksyoctowych a wartościami K_i lub IC_{50} (w pracy nie wyznaczono korelacji) wskazuje, że kwasowość jest czynnikiem determinującym inhibicyjne działanie badanych kwasów na ATPazy.

Podobne wyniki uzyskano podczas oceny chelatującego działania AAA na jony wapnia i magnezu *in vitro*. Stwierdzono, że efektywne stężenia (EC_{50}) AAA rosły wraz ze wzrostem pKa i Log P, a zatem efektywne działanie chelatujące malało (Starek i Nowak, 2006).

Dane te wskazywałyby, że u podstaw hamującego działania AAA na aktywność ATPaz błon erytrocytarnych leży mechanizm chelatowania przede wszystkim jonów wapnia. Chelatowanie jonów magnezu, wielokrotnie słabiej zaznaczone, nie ma większego znaczenia, bo chociaż zachodzi to jednak nie ma istotnego wpływu na aktywność Mg^{2+} -ATPazy.

ATPaza aktywowana jonami sodu i potasu jest enzymem zawierającym grupy sulfhydrylowe w centrum katalitycznym hamowanym przez imid kwasu n-etylomaleinowego (NEM), kwas p-chlorortęciobenzoesowy (PCMB) i inne blokery grup sulfhydrylowych. Inhibitorem enzymu jest również disulfid glutationu (GSSG) natomiast ATP chroni enzym przed inhibicją, szczególnie w obecności jonów potasu (Dick i wsp, 1969). Tak więc deficyt ATP obserwowany w ostrym zatruciu, m. in. BE, może być odpowiedzialny za spadek aktywność Na^+/K^+ -ATPazy.

Spadek aktywności tego enzymu w błonach erytrocytarnych obserwowano również u ludzi narażonych na niskie stężenia ołowiu. Zahamowanie aktywności Na^+/K^+ -ATPazy w erytrocytach jest związane z wystąpieniem niedokrwistości hemolitycznej u ludzi. Wykazano również prooksydacyjne działanie ołowiu i innych metali toksycznych, które prowadzi do spadku

poziomu GSH i grup SH związanych z białkami oraz do powstawania reaktywnych form tlenu (ROS), takich jak anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik hydroksylowy (Aust, 1989). Peroksydacja lipidów błon komórkowych może prowadzić do zahamowania aktywności Na^+/K^+ -ATPazy i Ca^{2+} -ATPazy w błonach erytrocytów (Yucebilgic i wsp., 2003).

Zahamowanie aktywności Ca^{2+} -ATPazy odpowiedzialnej za aktywne usuwanie jonów wapnia z komórki może być wynikiem blokowania cytoplazmatycznej kalmoduliny, białka wiążącego wapń. Białko to pośredniczy w kontroli aktywności cykazy adenyłowej, fosfodiesterazy cAMP, kinazy miozynowej i innych. Wykazano, że cykliczne leki przeciwdepresyjne (amitryptylina) oraz pochodne butylofenonu i fenotiazyny hamują aktywność Ca^{2+} -ATPazy aktywowanej przez kalmodulinę (Kietzen, 1988).

Przytoczone dane z piśmiennictwa wskazują na złożone mechanizmy zaburzeń aktywności ATPaz błonowych i ich konsekwencje.

7. Wnioski

1. Etery alkilowe glikolu etylenowego (EGAE) wywierają hemolityczne działanie na erytrocyty szczura *in vivo*. Efekt ten zależy od dawki i czasu jaki upłynął od podania badanych eterów.
2. Hemolityczne działanie EGAE jest wynikiem aktywacji metabolicznej związków macierzystych do odpowiednich kwasów alkoksyoctowych (AAA).
3. Kwasy alkoksyoctowe wywierają bezpośrednie działanie hemolityczne na erytrocyty szczura i człowieka. Działanie to jest silniej zaznaczone w przypadku krwinek szczura niż krwinek człowieka. Siła działania hemolitycznego tych kwasów rośnie wraz ze wzrostem ich lipofilowości i spadkiem kwasowości.
4. Zahamowanie przemiany metabolicznej EGAE do AAA za pomocą etanolu, jako konkurencyjnego metabolitu dla ADH lub za pomocą pirazolu lub metylopirazolu będących inhibitorami ADH, chroni erytrocyty przed hemolizą.
5. Wszystkie AAA hamują aktywność Na^+/K^+ -ATPazy komercyjnej *in vitro* oraz ATPaz w „cieniach” erytrocytów. Hamowanie to ma charakter kompetycyjny.
6. Aktywność ATPaz w erytrocytach szczura jest wyższa od aktywności tych enzymów w erytrocytach człowieka.
7. ATPaza aktywowana jonami sodu lub potasu oraz ATPaza wapniowa są bardziej wrażliwe na inhibicyjne działanie AAA od ATPazy magnezowej.
8. Siła działania inhibicyjnego AAA na ATPazy maleje wraz ze wzrostem lipofilowości, natomiast rośnie wraz ze wzrostem kwasowości.
9. Wydaje się, że mechanizm hemolitycznego działania EGAE *in vivo* oraz AAA *in vitro* nie jest wyłącznie związany z hamowaniem aktywności pomp jonowych w błonach erytrocytów. Ocena mechanizmów hemolitycznego działania badanych związków wymaga dalszych badań.

Hemolityczne działanie eterów alkilowych glikolu etylenowego – rola ATPazy

Streszczenie

Celem badań była ocena hemolitycznego działania eterów alkilowych glikolu etylenowego (EGAE) *in vivo* oraz kwasów alkoksyoctowych (AAA), będących metabolitami EGAE, *in vitro*. Badania przeprowadzono na szczurach Wistar, samcach, którym EGAE podawano podskórnie w jednorazowych dawkach w zakresie 0 – 10 mmol/kg w przypadku 2-metoksyetanolu (ME) i 2-etoksyetanolu (EE) lub 0 – 5 mmol/kg w przypadku 2-izopropoksyetanolu i 2-butoksyetanolu (BE).

Zakres badań obejmował liczbę erytrocytów (RBC), liczbę retikulocytów (Ret.), hematokryt (Ht), stężenie hemoglobiny całkowitej (HGB), stężenie hemoglobiny osoczowej (HGB_o), objętość erytrocytów (MCV), średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach (MCHC), średnią masę hemoglobiny w krwince (MCH) i stężenie HGB w moczu.

Ponadto, określono ochronne działanie etanolu, metylopirazolu (ME) i pirazolu w przebiegu ostrej hemolizy indukowanej BE.

W badaniach *in vitro* oceniono hemolityczne działanie AAA na erytrocyty szczura i człowieka przyjmując za kryteria RBC, Ht i MCV.

Ponadto, oceniono wpływ AAA na aktywność komercyjnej Na⁺/K⁺-ATPazy oraz Na⁺/K⁺-ATPazy, Ca²⁺-ATPazy i Mg²⁺-ATPazy w cieniach erytrocytów szczura i człowieka *in vitro*.

Stwierdzono zróżnicowane działanie hemolityczne EGAE w warunkach *in vivo*. ME i EE praktycznie nie działały hemolitycznie w zakresie zastosowanych dawek. Natomiast IPE i BE wywierały silne działanie hemolityczne, które manifestowało się zmianami wszystkich wskaźników

hematologicznych łącznie ze wzrostem stężenia HGB_o i hematurią. Zmiany te wykazywały zależności od dawki i czasu jaki upłynął od podania ksenobiotyku. Proces zdrowienia zwierząt wynosił 5-25 dni.

Etanol jako substrat ADH oraz ME i PY, jako inhibitory tego enzymu, działały ochronnie w zatruciu BE.

AAA wykazywały bezpośrednie działanie hemolityczne na erythrocyty szczura i człowieka. Przy czym działanie to było silniejsze w przypadku krwinek szczura. Siła działania hemolitycznego AAA rosła wraz ze wzrostem lipofilowości i spadkiem kwasowości tych metabolitów.

Aktywności ATPaz w „cieniach” erythrocytów szczura były wyższe od aktywności w cieniach erythrocytów człowieka. Wszystkie AAA hamowały aktywność komercyjnej Na⁺/K⁺-ATPazy *in vitro*, przy czym hamowanie to miało charakter kompetycyjny. Hamowanie ATPaz w cieniach erythrocytów szczura było silniej zaznaczone niż w przypadku erythrocytów człowieka. Działanie hamujące było najsilniejsze w odniesieniu do Na⁺/K⁺-ATPazy oraz Ca²⁺-ATPazy. Stopień zahamowania enzymów malał ze wzrostem lipofilowości i spadkiem kwasowości AAA. Ponadto, obserwowano hamowanie aktywności Mg²⁺-ATPazy niezależne od rodzaju badanego kwasu.

W konkluzji stwierdzono, że hemolityczne działanie EGAE *in vivo* oraz AAA *in vitro* nie jest pośredniczone wyłącznie przez spadek aktywności ATPaz błonowych. Być może istnieją inne mechanizmy odpowiedzialne za to działanie.

Hemolytic effect of ethylene glycol alkyl ethers – the role of ATPases.

Summary

The purpose of the studies were to compare the hemolytic effect of ethylene glycol alkyl ethers (EGAE) *in vivo* and alkoxyacetic acids (AAA) *in vitro*. AAA are the major metabolites of EGAE and are considered to be the proximate toxic metabolites. Male, Wistar, rats were subcutaneously treated with single doses of 0 – 10,0 mmol/kg body weight 2-methoxyethanol (ME) and 2-ethoxyethanol (EE) or 0 – 5 mmol/kg body weight 2-isopropoxyethanol (IPE) and 2-butoxyethanol (BE).

The following parameters were measured at *in vivo* study: red blood cells (RBC) and reticulocyte counts (Ret.), packed cell volume (Ht), total hemoglobin concentration (HGB), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC). In addition, free hemoglobin concentration (HGB_o) in the plasma and urine were also determined.

Furthermore, the current investigation was undertaken to compare the protective effect of both pyrazole (PY) and methylpirazole (MP), as well as ethanol in male rats acutely intoxicated with BE.

Also, hematological effects of AAA in rats and human RBC *in vitro* were examined.

Moreover, the relationship between AAA and brain synaptosomal Na⁺/K⁺-ATPase activity and Na⁺/K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activity in rat and human erythrocyte membranes were evaluated.

In the study, it was found that there are pronounced qualitative and quantitative differences in the toxic effects of the individual EGAE. Both ME and EE at dose applied in the experiment did not induced haemolytic anemia. In the same conditions, IPE and BE caused strong hematological effects.

Hemolytic anemia was evidenced by changes in all hematological indices. The obtained results were dose- and time- dependent.

The results of the present study indicate that ethanol, PY and MP exert distinct protective effect in rats subcutaneously intoxicated with BE.

The data presented in this paper clearly demonstrated that AAA had significant effect on rat and human erythrocytes. Human red blood cells were less sensitive. The hematotoxic potential of examined chemicals increase with the total number of ether carbons indicated that lipophility of these AAA is critical for their hemolytic activity.

AAA inhibit brain synaptosomal Na^+/K^+ -ATPase activity in competitive way. The ATPases in the rat erythrocyte membrane were more sensitive on inhibitory effects of AAA than the human ATPases. The inhibition of activity ATPase in the human erythrocyte membrane was observed at higher AAA-concentrations than in the case of rat erythrocytes. Activity of Ca^{2+} -ATPase in human erythrocyte membrane was inhibited the most. The inhibitory potential of AAA decreased with the increase of their lipophility and decrease of their acidity. The inhibition of Mg^{2+} -ATPase activity was not dependent on AAA kind.

In conclusion, we can say that hemolytic effect of EGAE *in vivo* and AAA *in vitro* is not only associated with the inhibition of ATPase activity in erythrocyte membrane. It seems that there are other mechanisms underlying of hematotoxicity of EGAE.

10. Piśmiennictwo

1. Aakervik O., Svendsen J., Jacobsen D.: Severe ethylene glycol poisoning treated with fomepizole (4-methylpyrazole). *Tidsskr. Nor. Laegeforen* 2002, 122, 2444 – 2446.
2. Aasmoe L., Aarbakke J.: Gender difference in the elimination of 2-methoxyethanol, methoxyacetic acid and ethoxyacetic acid in rat. *Xenobiotica* 1997, 27, 1237 – 1244.
3. Aasmoe L., Winberg J.O., Aarbakke J.: The role of liver alcohol dehydrogenase isoenzymes in the oxidation of glycol ethers in male and female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998, 150, 86 – 90.
4. Abraham E.C., Taylor J.F., Lang C.A.: Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism. *Biochem. J.* 1978, 174, 819 – 825.
5. ACC, 2000, American Chemistry Council. Ethylene glycol ethers Panel, EGBE: A world of solutions, July, www.egep.org.
6. Aust S.D.: Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl. Nutr. Dieta. US* 1989, 266 – 277.
7. Barratt M.D., Castell J.V., Chamberlain M., Combes R.D., Dearden J.C., Fantem J.H., Gerner I., Giuliani A., Gray T.J.B, Zbinden P.: The integrated use of alternative approaches for predicting toxic hazard. The report and recommendations of ECVAM Workshop 8. *ALTA*, 1995, 23, 410-429.
8. Bartnik F.G., Reddy A.K., Klecak G., Zimmermann V., Hostynek J.J., Kunstler K.: Percutaneous absorption, metabolism, and hemolytic activity of n-butoxyethanol. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1987, 8, 59 – 70.
9. Bauer P., Weber M., Mur J.M., Protois J.C., Bollaert P.E., Condi A.: Transient non-cardiogenic pulmonary edema following massive ingestion of ethylene glycol butyl ether. *Intensive Care Med.* 1992, 18, 250 – 251.

10. Beutler E.: Preparation of hemolysates. In red cell metabolism, 1984, ed.10.
11. Bingham E.: Cochrssen, B.; Powell, C.H.; Patty's Toxicology Volumes 1-9 5th ed. John Wiley & Sons. New York, N.Y. (2001), p. V7 121.
12. Boatman R.J.: International industry initiatives to improve the glycol ether health effects knowledge base. *Toxicol. Lett.* 2005, 156, 39 – 50.
13. Brent J.: Current management of ethylene glycol poisoning. *Drugs* 2001, 61, 979 – 988.
14. Breslin W.J., Phillips J.E., Lomax L.G., Bartels M.J., Dittenber D.A., Calhoun L.L., Miller R.R.: Hemolytic activity of ethylene glycol phenyl ether (EGPE) in rabbits. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1991, 17, 466 – 481.
15. Burkhart K.K., Donovan J.W.: Hemodialysis following butoxyethanol ingestion. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1998, 36, 723 – 725.
16. Carpenter C.P., Pozzani U.C., Weil C.S., Nair J.H., Keck G.A., Smyth H.F.: The toxicity of butyl cellosolve solvent. *AMA Arch. Ind. Health* 1956, 14, 114 – 131.
17. Chiewchanwit T., Au W.W.: Cytogenetic effects of 2-methoxyethanol and its metabolite, methoxyacetaldehyde, in mammalian cells in vitro. *Mutat. Res.* 1994, 320, 125 – 132.
18. Combes R., Barratt M., Bals M.: An overall strategy for the testing of chemicals for human hazard and risk assessment under the EU REACH system. *ALTA*, 2003, 31, 7-19.
19. Coomes M.W., Norling A.H., Pohl R.J., Muller D., Fouts J.R.: Foreign compound metabolism by isolated skin cells from the hairless mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983, 225, 770 – 777.
20. Corley R.A., Bormett G.A., Ghanayem B.I.: Physiologically based pharmacokinetics of 2-butoxyethanol and its major metabolite, 2-butoxyacetic acid, in rats and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994, 129, 61 – 79.

21. Corley R.A., Grant D.M., Farris E., Weitz K.K., Soelberg J.J., Thrall K.D., Poet T.S.: Determination of age and gender differences in biochemical processes affecting the disposition of 2-butoxyethanol and its metabolites in mice and rats to improve PBPK modeling. *Toxicol. Lett.* 2005, 156, 127 – 161.
22. Corley R.A., Markham D.A., Banks C., Delorme P., Masterman A., Houle J.M.: Physiological based pharmacokinetics and the dermal absorption of 2 – butoxyethanol vapour by humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, 39, 120 – 130.
23. Corthals SM, Kamendulis LM, Klaunig JE.: Mechanisms of 2-butoxyethanol-induced hemangiosarcomas. *Toxicol. Sci.* 2006, 92, 378-86.
24. Cronin M.T.D.: The current status and future applicability of Quantitative Structure- Activity Relationship (QSARs) in predicting toxicity. 2002, *ALTA*, 30 (Suppl. 2), 81-84.
25. Detraglia M., Cook F.B., Stasiw D.M., Cerny L.C.: Erythrocyte fragility in aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1974, 29, 213 – 219.
26. Dick D.A., Dick E.G., Tosteson D.C.: Inhibition of adenosine triphosphatase in sheep red cell membranes by oxidized glutathione. *J. Gen. Physiol.* 1969, 54, 123 – 133.
27. Dill J.A., Lee K.M., Bates D.J., Anderson D.J., Johnson R.E., Chou B.J., Burka L.T., Roycroft J.H.: Toxicokinetics of inhaled 2 – butoxyethanol and its major metabolite, 2 – butoxyacetic acid, in F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998, 153, 227 – 242.
28. Dodd D.E., Snellings W.M., Maronpot R.R., Ballantyne B.: Ethylene glycol monobutyl ether: acute, 9 – day, and 90 – day vapor inhalation studies in Fisher 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1983, 68, 405 – 414.

29. Doe J.E.: Further studies on the toxicology of the glycol ethers with emphasis on rapid screening and hazard assessment. *Environ. Health Perspect.* 1984, 57, 199 – 206.
30. Doe J.E., Samuels D.M.: Comparative aspects of the reproductive toxicology by inhalation in rats of ethylene glycol monomethyl ether and isopropylethylene glycol ether. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984, 15, 43 – 47.
31. Ezov N., Levin-Harrus T., Mittelman M., Redlich M., Shabat S., Ward S.M., Peddada S., Nyska M., Yedgar S., Nyska A.: A chemically induced rat model of hemolysis with disseminated thrombosis. *Cardiovasc. Toxicol.* 2002, 2, 181 – 94.
32. Foster P., Lloyd S.C., Blackburn D.M.: Comparison of the in vivo and in vitro testicular effects produced by methoxy –, ethoxy – and N – butoxy acetic acids in the rat. *Toxicology* 1987, 43, 17 – 30.
33. Gardos G.: The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1958, 30, 653 – 654.
34. Genium's Handbook of Safety, Health and Environmental Data for Common Hazardous Substances. Vol. 1. New York, Mc Graw – Hill, 1999.
35. Gerner I., Schlede E.: Introduction of in vitro data into local irritation/corrosion testing strategies by means of SAR considerations: assessment of chemicals. *Toxicol. Lett.* 2002, 127, 169-75.
36. Ghanayem B.I.: Metabolic and cellular basis of 2 – butoxyethanol induced hemolytic anemia in rats and assessment of human risk in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 1989, 38, 1679 – 1684.
37. Ghanayem B.I.: An overview of the hematotoxicity of glycol ethers. *Occup. Hyg.* 1996, 2, 253 – 268.
38. Ghanayem B.I., Blair P.C., Thompson M.B., Maronpot R.R., Matthews H.B.: Effect of age on the toxicity and metabolism of ethylene glycol

- monobutyl ether (2-butoxyethanol) in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1987, 91, 222 – 234.
39. Ghanayem B.I, Burka L.T, Matthews H.B.: Metabolic basis of ethylene glycol monobutyl ether (2 - butoxyethanol) toxicity: Role of alcohol and aldehyde dehydrogenases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987, 242, 222 – 231.
40. Ghanayem B.I., Burka L.T., Matthews H.B.: Structure-activity relationships for the in vitro hematotoxicity of N-alkoxyacetic acids, the toxic metabolites of glycol ethers. *Chem. Biol. Interact.* 1989, 70, 339 – 352.
41. Ghanayem B.I, Burka L.T., Sanders J.M., Matthews H.B.: Metabolism and disposition of 2 – butoxyethanol in rats. *Drug Metab. Dispos.* 1987, 15, 478 – 484.
42. Ghanayem B.I, Chapin R.: Calcium channel blockers protect against ethylene glycol monomethyl ether (2-methoxyethanol)-induced testicular toxicity. *Exp. Mol. Pathol.* 1990, 52, 279 – 90.
43. Ghanayem B.I, Long P.H., Ward S.M., Chanas B., Nyska M., Nyska A.: Hemolytic anemia, thrombosis, and infarction in male and female F344 rats following gavage exposure to 2 – butoxyethanol. *Exp. Toxic. Pathol.* 2001, 53, 97 – 105.
44. Ghanayem B.I, Sallivan C.A.: Assessment of the hemolytic activity of 2-BE and its major metabolite, butoxyacetic acid, in various mammals including humans. *Human Exp. Toxicol.* 1993, 12, 305 – 311.
45. Ghanayem B.I., Sanchez I.M., Matthews H.B.: Development of tolerance to 2-butoxyethanol-induced hemolytic anemia and studies to elucidate the underlying mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992, 112, 198 – 206.
46. Ghanayem B.I., Sanders J.M., Clark A.M., Bailer J., Matthews H.B.: Effects of dose, age, inhibition of metabolism and elimination on the

- toxicokinetics of 2-butoxyethanol and its metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990, 253, 136 – 143.
47. Ghanayem B.I, Ward S.M., Chanas B., Nyska A.: Comparison of the acute hematotoxicity of 2 – butoxyethanol in male and female F344 rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 2000, 19, 185 – 192.
48. Gietzen K., Mansard A., Bader H.: Inhibition of human erythrocyte Ca^{++} -transport ATPase by phenothiazines and butyrophenones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 94, 674 – 681.
49. Gijzenbergh F.P., Jenco M., Veulemans H., Groeseneken D., Verberckmoes R., Delooz H.H.: Acute butylglycol intoxication: a case report. *Hum Toxicol.* 1989, 8, 243 – 5.
50. Girault C., Tamion F., Moritz F., Callonnec F., Droy J.M., Bonmarchand G., Leroy J.: Fomepizole (4-methylpyrazole) in fatal methanol poisoning with early CT scan cerebral lesions. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1999, 37, 777 – 780.
51. Glass G.A., Gershon D.: Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochem. J.* 1984, 218, 531 – 537.
52. Grant D., Sulsh S., Jones H.B., Gangolli S.D., Butler W.H.: Acute toxicity and recovery in the hemapoetic system of rats after treatment with ethylene glycol monomethyl and monobutyl ethers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985, 77, 187 – 200.
53. Green C.E, Gordon G.R., Lin E., Cohen P.M., Nolen H.W., Peters J.H., Tyson C.A.: Comparative metabolism of glycol ethers in rat and human hepatocytes. *Toxicologist* 1989, 9, 239.
54. Haufroid V., Thirion F., Mertens P., Buchet J.P., Lison D.: Biological monitoring of workers exposed to low levels of 2-butoxyethanol. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1997, 70, 232 – 236.
55. Heindel J.J., Gulati D.K., Russell V.S., Reel J.R., Lawton A.D., Lamb J.C. 4th.: Assessment of ethylene glycol monobutyl and monophenyl

- rther reproductive toxicity using a continuous breeding protocol in Swiss CD – 1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1990, 15, 683 – 696,
56. Henle E.S., Luo Y., Gassmann W., Linn S.: Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. *J. Biol. Chem.* 1996, 30, 21177 – 86.
57. Hesketh R.: Intracellular calcium regulation and the measurement of free calcium in 2H3 cells and synaptosomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1985, 20, 221 S – 231 S.
58. Hobson D.W., D'Addario A.P., Bruner R.H., Uddin D.E.: A subchronic dermal exposure study of diethylene glycol monomethyl ether and ethylene glycol monomethyl ether in the male guinea pig. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1986, 6, 339 – 348.
59. Hoflack J.C., Lambolez L., Elias Z., Vasseur P.: Mutagenicity of ethylene glycol ethers and of their metabolites in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 1995, 341, 281 – 287.
60. Johanson G.: Toxicokinetics of inhaled 2 – butoxyethanol in man. *Scand. J. Work Environ. Health* 1986, 12, 594 – 602.
61. Johanson G.: Physiologically based pharmacokinetic modeling of inhaled 2 – butoxyethanol in man. *Toxicol. Lett.* 1986, 34, 23 – 31.
62. Johanson G.: Inhalation toxicokinetics of butoxyethanol and its metabolite butoxyacetic acid in the male Sprague-Dawley rat. *Arch. Toxicol.* 1994, 68, 588 – 594.
63. Julia P., Farres J., Pares X.: Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase. Tissue distribution and physical and enzymatic properties. *Eur J Biochem.* 1987, 162, 179 – 89.
64. Kaneko J.J.: Comparative erythrocyte metabolism. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 1974, 18, 117 – 153.
65. Kaphalia B.S., Ghanayem B.I., Ansari G.A.: Nonoxidative metabolism of 2 – butoxyethanol via fatty acid conjugation in Fisher 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1996, 49, 463 – 479.

66. Keith G., Coulais C., Edoth A., Bottin M.C., Rihn B.: Ethylene glycol monobutyl ether has neither epigenetic nor genotoxic effects in acute treated rats and in subchronic treated v – HA – ras transgenic mice. *Occup. Hyg.* 1996, 2, 237 – 249.
67. Ketttenis P.: The historic and current use of glycol ethers: a picture of change. *Toxicol. Lett.* 2005, 156, 5 – 11.
68. Kezic S., Monster A.C., Opdam J.J.G., de Wolff F.A.: Dermal exposure to vaporous and liquid organic solvents in volunteers. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997, 36, 190.
69. Kezic S., Mahieu K., Monster A.C., de Wolff F.A.: Dermal absorption of vaporous and liquid 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol in volunteers. *Occup. Environ. Med.* 1997a, 54, 38 – 43.
70. Knight D.J., Breheny D.: Alternatives to animal testing in the safety evaluation of products. *ALTA*, 2002, 30, 7-22.
71. Koshkaryev A., Barshtein G., Nyska A., Ezov N., Levin-Harrus T., Shabat S., Nyska M., Redlich M., Tsipis F., Yedgar S.: 2-Butoxyethanol enhances the adherence of red blood cells. *Arch. Toxicol.* 2003, 77, 465 – 469.
72. Krasavage W.J., Katz G.V.: Subchronic oral toxicity of ethylene glycol monobutyl ether in male rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1986, 6, 349 – 55.
73. Ku W.W., Ghanayem B.I., Chapin R.E., Wine R.N.: Comparison of the testicular effects of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs. *Exp. Mol. Pathol.* 1994, 61, 119 – 33.
74. Litovitz T.L., Bailey K.M, Schmitz B.F, Holm K.C, Klein-Schwartz W.: Annual report of the American Association of Poisoning Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am. J. Emerg. Med.*, 1990, 9, 461 – 509.

75. Lockley D.J., Howes D., Williams F.M.: Percutaneous penetration and metabolism of 2-ethoxyethanol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002, 180, 74 – 82.
76. Lockley D.J., Howes D., Williams F.M.: Cutaneous metabolism of glycol ethers. *Arch Toxicol.* 2005, 79, 160 – 8.
77. Lowry O., Lopez J.: The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.* 1946, 162, 421 – 428.
78. Mc Gregor D.B.: Genotoxicity of glycol ethers. *Environ. Health Perspect.* 1984, 57, 97 – 103.
79. Medinsky M.A., Sing G., Bechtold W.E., Bond J.A., Sabourin P.J., Birnbaum L.S., Henderson R.F.: Disposition of three glycol ethers administered in drinking water to male F344/N rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1990, 102, 443 – 455.
80. Morel G., Lambert A.M., Rieger B., Subra I.: Interactive effect of combined exposure to glycol ethers and alcohols on toxicodynamic and toxicokinetic parameters. *Arch. Toxicol.* 1996, 70, 519 – 25.
81. Morrison R. Boyd.: *Chemia organiczna*, PWN, 1986.
82. Nitter-Hauge S.: Poisoning with ethylene glycol monomethyl ether. Report of two cases. *Acta Med. Scand.* 1970, 188, 277.
83. Noji S., Taniguchi S., Kon H.: Spin label study of erythrocyte deformability. Ca^{2+} -induced loss of deformability and the effects of stomatocytogenic reagents on the deformability loss in human erythrocytes in shear flow. *Biophys. J.* 1987, 52, 221 – 227.
84. Nyska A., Maronpot R.R., Long P.H., Roycroft J.H., Hailey J.R., Travlos G.S., Ghanayem B.I.: Disseminated thrombosis and bone infarction in female rats following inhalation exposure to 2-butoxyethanol. *Toxicol. Pathol.* 1999, 27, 287 – 94.
85. Nyska A., Moomaw C.R., Foley J.F., Maronpot R.R., Malarkey D.E., Cummings C.A., Peddada S., Moyer C.F., Allen D.G., Travlos G., Chan P.C.: The hepatic endothelial carcinogen riddelliine induces

- endothelial apoptosis, mitosis, S phase, and p53 and hepatocytic vascular endothelial growth factor expression after short-term exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002, 184, 153 – 64.
- 86.O'Rear E.A., Udden M.M., McIntire L.V., Lynch E.C.: Reduced erythrocyte deformability associated with calcium accumulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982, 7, 274-80.
- 87.Orrenius S., Nicotera P.: On the role of calcium in chemical toxicity. *Arch. Toxicol. Suppl.* 1987, 11, 11 – 19.
- 88.Paez A.M., Shannon M., Maher T., Quang L.: Effects of 4-methylpyrazole on ethanol neurobehavioral toxicity. *Acad. Emerg. Med.* 2004, 11, 820 – 826.
- 89.Patty F.A.: *Industrial hygiene and toxicology*. 4th edition, 1994, 2761 – 2803.
- 90.Rambourg-Schepens M.O., Buffet M., Bertault R., Jaussaud M., Journe B., Fay R., Lamiable D.: Severe ethylene glycol butyl ether poisoning. Kinetics and metabolic pattern. *Human Toxicol.* 1988, 7, 187-189.
- 91.Ramot Y., Lewis D.A., Ortel T.L., Streicker M., Moser G., Elmore S., Ward S.M., Peddada S., Nyska A.: Age and dose sensitivities in the 2-butoxyethanol F344 rat model of hemolytic anemia and disseminated thrombosis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2007, 58, 311 – 322.
- 92.Ratcliffe J.M., Schrader S.M., Clapp D.E., Halperin W.E., Turner T.W., Hornung R.W.: Semen quality in workers exposed to 2-ethoxyethanol. *Br. J. Ind. Med.* 1989, 46, 399 – 406.
- 93.Romer K.G., Balge F., Freundt K.J.: Ethanol-induced accumulation of ethylene glycol monoalkyl ethers in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 1985, 8, 255 – 264.
- 94.Rowe V.K., Wolf M.A.: *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 4th ed., vol. II, G.D. Clayton and F.E. Clayton, Eds. John Wiley and Sons. New York 1994, 2761 – 2966.
- 95.RTECS, 2001 – Komputerowa Baza Danych

96. Rule H.G, Hay W., Paul J.: Optical activity and polarity of substituent groups. Part VIII. Growing-chain effects and the orthoeffects in benzoic esters. *J. Chem. Soc.* 1928, 1347 – 1361.
97. Rybczyńska M., Chmiel J., Philips H.: Effects of nitroheterocycling sensitizers on erythrocyte membrane ATP – ase activity. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1984, 36, 307 – 312.
98. Samuels D.M., Doe J.E., Tinston D.J.: The effects on the rat testis of single inhalation exposures to ethylene glycol monoalkyl ethers, in particular isopropylethylene glycol ether. *Arch. Toxicol. Suppl.* 1984, 7, 167 – 70.
99. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits 2005, <http://ec.europa.eu.com>.
100. Schroit A.J., Madsen J.W., Tanaka Y.: In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 5131 – 5138.
101. Schroit A.J., Tanaka Y., Madsen J., Fidler I.J.: The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry. *Biol. Cell.* 1984, 51, 227 – 238.
102. Shiga T., Maeda N., Suda T., Kon K., Sekiya M.: The decreased membrane fluidity of in vivo aged, human erythrocytes. A spin label study. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, 3, 84 – 95.
103. Shih T.-S., Liou S.H., Chen C.Y., Smith T.J.: Urinary 2-methoxy acetic acid accumulation in response to 2-methoxy ethanol exposure. *Arch. Environ. Health.* 2001, 56, 20 – 25.
104. Shih T.-S., Hsieh A.-T., Chen Y.-H., Liao G.-D., Chen H.-Y., Chou J.-S., Liou S.-H.: Follow up study of haematological effects in workers exposed to 2-methoxyethanol. *Occup. Environ. Med.* 2003, 60, 130 – 135.

105. Shyr L.J., Sabourin P.J., Medinsky M.A., Birnbaum L.S., Henderson R.F.: Physiologically based modeling of 2-butoxyethanol disposition in rats following different routes of exposure. *Environ. Res.* 1993, 63, 202 – 18.
106. Smith R.: Review of glycol ether and glycol ether solvents used in the coating industry. *Environ. Health Perspect.* 1984, 57, 1 – 4.
107. Smyth H.F. Jr, Carpenter C.P., Weil C.S., Pozzani U.C., Striegel J.A., Nycum J.S.: Range-finding toxicity data: List VII. *Am. Ind. Hyg. Assos. J.* 1969, 30, 470 – 476.
108. Starek A., Jarosz J.: Hemolytic anemia induced by 2 – butoxyethanol in rats. *Acta Pol. Toxicol.* 2001, 2, 165 – 174.
109. Starek A., Jarosz J., Szymczak W.: Comparison of the hemolytic activity of isopropoxyethanol and phenoxyethanol. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 2004, 17, 339 – 346.
110. Starek A., Lepiarz W., Starek-Świechowicz B., Jarosz J.: A comparative study of the acute hematotoxicity of three ethylene glycol monoalkyl ethers in rats. *Acta Pol. Toxicol.* 2002, 10, 1 – 16.
111. Starek A., Nowak P.: The alkoxyacetic acids as calcium and magnesium chelating agents in vitro. *Acta Pol. Pharm-Drug Res.* 2006, 63, 89 – 94.
112. Starek A., Szabla J., Szymczak W., Zapór L.: Comparison of the acute hematotoxicity of 2-methoxyethanol, 2-ethoxyethanol and 2-butoxyethanol in male rats. *Acta Toxicol.* 2006, 14, 65 – 74.
113. Starek A., Szabla J., Starek-Świechowicz B.: Pyrazole and methylpyrazole for the treatment of 2-butoxyethanol poisoning. *Acta Pol. Pharma.-Drug Res.* 2007, 64, 93 – 100.
114. Tanii H., Saito S., Hashimoto K.: Structure-toxicity relationship of ethylene glycol ethers. *Arch. Toxicol.* 1992, 66, 368 – 371.
115. The Merck Index.: An encyclopedia of chemicals, drugs and biological 13th ed., 2001, Merck Co. Inc, Whitehouse Station, NJ, 7345.

116. Tyl R.W.: Draft Final Report on the Developmental Toxicity Evaluation of Inhaled Isopropyl Cellosolve Vapor in CD Rats. Chemical Industry Institute of Toxicology, for Union Carbide Corporation, Study No. 96U1661, Aug. 20, 1997 (cyt. za Patty).
117. Tyl R.W., Millicovsky G., Dodd D.E., Pritts I.M., France K.A., Fisher L.C.: Teratologic evaluation of ethylene glycol monobutyl ether in Fisher 344 rats and New Zealand white rabbits following inhalation exposure. *Environ. Health Perspect.* 1984, 57, 47 – 68.
118. Tyler T.R.: Acute and subchronic toxicity of ethylene glycol monobutyl ether. *Environ. Health Perspect.* 1984, 57, 185 – 191.
119. U.S Consumer Product Safety Commission, 2005, www.cpsc.gov.
120. Udden M.M: Effect of calcium and quinine on butoxyacetic acid (BAA)-induced hemolysis of rat red blood cells (RBCs). *Toxicol. Letters* 1998, 95, 227 – 227.
121. Udden M.M.: Rat erythrocyte morphological changes after gavage dosing with 2-butoxyethanol: a comparison with the in vitro effects of butoxyacetic acid on rat and human erythrocytes. *J. Appl. Toxicol.* 2000, 20, 381 – 387.
122. Udden M.M.: In vitro sub – hemolytic effects of butoxyacetic acid on human and rat erythrocytes. *Toxicol. Sciences* 2002, 69, 258 – 264.
123. Udden M.M., Patton C.S.: Hemolysis and deformability of erythrocytes exposed to butoxyacetic acid, a metabolite of 2-butoxyethanol: I. Sensitivity in rats and resistance in normal humans. *J. Appl. Toxicol.* 1994, 14, 91 – 96.
124. Udden M.M., Patton C.S.: Butoxyacetic acid-induced hemolysis of rat red blood cells: effect of external osmolarity and cations. *Toxicol. Lett.* 2005, 156, 81 – 93.
125. Vincent R., Cicoletta A., Subra I., Rieger B., Poirot P., Pierre F.: Occupational exposure to 2-butoxyethanol for workers using window cleaning agents. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 1993, 8, 580 – 586.

126. Wagner V.O.: Bacterial reverse Mutation Assay with an Independent Repeat Assay. Final Report to UCC, Laboratory Study No. G96BH00.502001, Microbiological Associates, Rockville, MD, Nov. 22, 1996 (cyt. za Patty).
127. Welch L.S., Schrader S.M., Turner T.W., Cullen M.R.: Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters: II. Male reproduction. *Am. J. Ind. Med.* 1988, 14, 509 – 526.
128. Wesołowski W., Gromiec J.P.: Occupational exposure in Polish paint and lacquer industry. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 1997, 10, 79 – 88.
129. Wilkin J.K., Stewart J.H.: Substrate specificity of human cutaneous alcohol dehydrogenase and erythema provoked by lower aliphatic alcohols. *J. Invest. Dermatol.* 1987, 88, 452 – 454.
130. Wolff D., Cecchi X., Spalvins A., Canessa M.: Charybdotoxin blocks with high affinity the Ca-activated K⁺ channel of Hb A and Hb S red cells: individual differences in the number of channels. *J. Membr. Biol.* 1988, 106, 243 – 252.
131. Worth A.P., Balls M.: Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status and future prospects. A report prepared by ECVAM and the ECVAM Working Group on Chemicals. 2002, 30 (supl. 1), 1-125.
132. Yargicoglu P., Gumusluoriob S., Agar A., Korgun D.K., Kucukatay V.: Effect of sulfur dioxide inhalation on erythrocyte antioxidant status, food intake, and lipid peroxidation during aging. *Arch. Environ. Health.* 2001, 56, 53 – 57.
133. Yucebilgic G., Bilgin R., Tamer L., Tukul S.: Effects of lead on Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities and lipid peroxidation in blood of workers. *Int. J. Toxicol.* 2003, 22, 95 – 97.
134. Zgirski A., Gondko R.: *Obliczenia biochemiczne*. PWN, 1998.

Niniejsza praca była częściowo subsydiowana przez
Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu
promotorskiego Nr **N 404 003 31/0129**.

Publikacje powstałe podczas realizacji pracy doktorskiej:

1. Starek A., Jarosz J.: Hemolytic anemia induced by 2 – butoxyethanol in rats. *Acta Pol. Toxicol.*, 2001, 2, 165 – 174.
2. Starek A., Lepiarz W., Starek-Świechowicz B., Jarosz J.: A comparative study of the acute hematotoxicity of three ethylene glycol monoalkyl ethers in rats. *Acta Pol. Toxicol.*, 2002, 10, 1 – 16.
3. Starek A., Jarosz J., Szymczak W.: Comparison of the hemolytic activity of isopropoxyethanol and phenoxyethanol. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 2004, 17, 339 – 346.
4. Starek A., Szabla J., Szymczak W., Zapór L.: Comparison of acute hematotoxicity of 2-methoxyethanol, 2-ethoxyethanol and 2-butoxyethanol in male rats. *Acta Toxicol.*, 2006, 14, 65 – 74.
5. Starek A., Szabla J., Starek-Świechowicz B.: Pyrazole and methylpyrazole for the treatment of 2-butoxyethanol poisoning. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 2007, 64, 93 – 100.