

Janina Gabrielska\*, Katarzyna Pyrkosz\*, Stanisław Przystański\*,  
Izabela Żukowska\*\*, Maria Zamaraeva\*\*

## ODDZIAŁYWANIE ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH OŁOWIU I CYNY Z ALBUMINĄ W OBECNOŚCI UVB

### INTERACTION OF ORGANOLEAD AND ORGANOTIN COMPOUNDS WITH ALBUMIN IN THE PRESENCE OF UVB

**Słowa kluczowe:** utlenianie albuminy, organiczne związki ołowiu i cyny, grupy tiulowe, mostki disiarczkowe.

**Key words:** albumin oxidation, lead and tin organic compounds, thiol groups, disulphide bridges.

*Albumin present in the blood circulation acts as a protein necessary for transporting the body unpolar substances. It also binds toxic substances decreasing thus their harmful effect in the organism. The unphysiological factors that induce changes in protein structure may result in decreased detoxication function of albumin. This work investigates the effect of UVB irradiation and triphenyl- (TPhT), diphenyltin (DPhT), tributyl- (TBT), dibutyltin (DBT) chlorides and triphenyllead chloride (TPhPb) on the possibility of albumin oxidation, and the influence of the trolox on this particular process. The spectrophotometric method was used to measure the thiol group concentration as influenced by both factors (UVB and organo-metallics). The results show that UVB irradiation probably causes breaking of the disulfide bridges in albumine and contributes to protein structural changes. They also effects of the interaction of organic lead and tin forms with albumin.*

---

\* Prof. dr hab. Janina Gabrielska, mgr inż. Katarzyna Pyrkosz i prof. dr hab. Stanisław Przystański – Katedra Fizyki i Biofizyki, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław; tel.: 71 320 51 72; 71 320 51 67; e-mail: janina.gabrielska@up.wroc.pl; stanislaw.przystanski@up.wroc.pl

\*\* Mgr inż. Izabela Żukowska, prof. dr hab. Maria Zamaraeva – Instytut Biologii, Zakład Biofizyki, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok; tel.: 85 745 73 66; 85 745 73 49; e-mail: j.zukowska@uwb.edu.pl; mzamrae@uwb.edu.pl

## 1. WPROWADZENIE

Organiczne związki cyny i ołowiu (METO), są powszechnie obecne w środowisku człowieka [Craig 2003] przez co mogą dostawać się do organizmów żywych z różnych źródeł [Colosio i in. 1991]. Toksyczność METO w organizmach żywych wynika w pierwszym rzędzie z ich oddziaływań z błonami komórkowymi zmieniającymi ich strukturę i funkcje [Langner i in. 1998; Hładyszowski i in. 2002; Chicano i in. 2001, 2002]. Albumina obecna w krwioobiegu wiąże substancje toksyczne dla organizmu co powoduje obniżenie ich szkodliwych efektów. Badania *in vitro* wskazują również, że albumina adsorbując się w fazie lipidowej błon komórkowych zmienia ich mikroptylnność i przepuszczalność [Tsunoda i in. 2001], przez co obniża zdolność lipofilowych związków metaloorganicznych do wiązania się z dwuwarstwą liposomów fosfatydylocholinowych [Gabrielska i in. 2008]. Toksyczność związków METO na poziomie komórkowym wiąże się między innymi ze skutkami procesu peroksydacji, z uwagi na ich charakter wolnorodnikowy w obecności promieniowania UVC [Gabrielska i in. 2006]. Pod wpływem tego promieniowania przyjmują one formy wolnorodnikowe, co sprzyja między innymi utlenianiu lipidów błonowych. Proces ten jest skutecznie redukowany przez niektóre flawonoidy np. kwercetynę, mirycetynę i kempferol [Soczyńska-Kordala 2004; Gabrielska i in. 2004, 2006]. Wykazano, że organiczne związki cyny (METO), np. chlorki trifenylo- (TPhT) i difenylocyny (DPhT) oraz tributyllo- (TBT) i dibutylocyny (DBT), w różnym stopniu są kompleksowane przez kwercetynę (stałe wiązania wykazują następującą sekwencję wzrostu: TBT  $\approx$  TPhT > DPhT  $\approx$  DBT zarówno w obecności metanolu jako roztworu odniesienia, jak i w obecności albuminy), wskazując na tworzenie silniejszych kompleksów kwercetyny ze związkami difenylo- i dibutylocyny niż z formami trifenylo- i tributyllocyny.

## 2. CEL, MATERIAŁY I METODY

Celem badań, których wyniki stanowią przedmiot rozważań w niniejszym opracowaniu było zbadanie działania promieniowania UVB oraz związków METO na możliwość utleniania albuminy oraz wpływ na ten proces znanego antyoksydantu – troloxu. Poziom indukcji utlenienia albuminy przez badane związki i promieniowanie UVB zbadano metodą spektrofotometryczną, określając zmiany stężenia wolnych SH-grup pod wpływem obydwu czynników.

Trolox, albuminę wołową (BSA), roztwór Ellmana, 2,4-dinitrofenylohydrazynę, chlorowodorek guanidyny otrzymano z Sigmay (Niemcy), octan etylu, etanol, metanol, kwas trichloroocetowy oraz chloroform z POCH Gliwice. Fenylowe i butylowe związki cyny i ołowiu wprowadzono z firmy Alfa Products (Niemcy). Odczynniki do sporządzenia buforów zakupiono w POCH Gliwice. Lampa UV 109B firmy Waldmann (Niemcy) pracuje w zakresie długości światła 285–350 nm przy maksimum emisji od 310 nm do 315 nm.

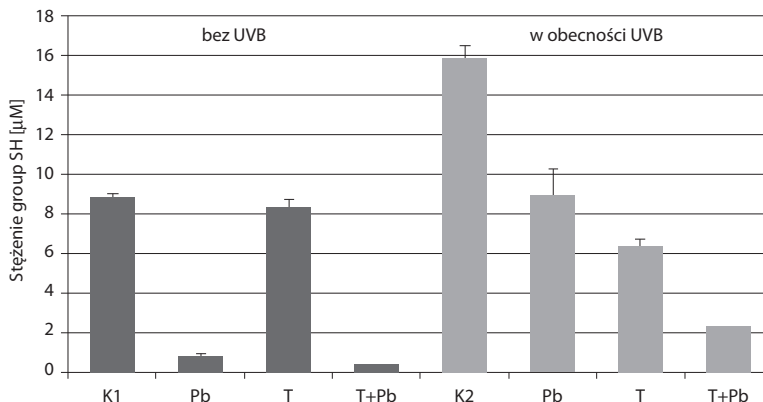
Oksydację albuminy wywoływano w 0,25 mM buforze fosforanowym, pH=7,8 (1,5 mg albuminy/1ml buforu) w obecności badanych związków METO (50  $\mu\text{M}$ ), oraz naświetlaniu przez dwie godziny promieniowaniem UVB. Równolegle przygotowano próbki o takim samym składzie, ale niepoddane ekspozycji UVB oraz próbę kontrolną (albumina z buforem fosforanowym). Po dwóch godzinach do wszystkich prób dodano 50  $\mu\text{l}$  roztworu Ellmana. Po upływie dziesięciu minut zmierzono absorbancję przy dwóch długościach fali (412 nm i 550 nm) względem odnośnika (bufor fosforanowy + roztwór Ellmana). Od wartości absorbancji zmierzonej przy 412 nm odejmowano wartość przy 550 nm. Zawartość grup tiolowych obliczono na podstawie molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon=13\ 600\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Otrzymane wyniki przedstawiono jako stężenie produktu utlenienia, w  $\mu\text{M}$  grup SH.

### 3. WYNIKI I DYSKUSJA

Molekularny mechanizm toksyczności organicznych związków cyny i ołowiu jest przedmiotem ciągłych badań [Musmeci i in. 1992; Santroni i in. 1997; Bragadin i Marton 1997; Bragadin i in. 2001, 2007] ze względu na efekty biologiczne obejmujące cały organizm. Jednym z aspektów toksyczności METO jest możliwość indukowania utlenienia biomolekuł [Ramstock i in. 1980; Petrosyjan i in. 2002; Gabrielska i in. 2006]. Promieniowanie UV (w szczególności UVC i UVB o zakresie długości od 200 nm do 320 nm) w oddziaływaniu z molekułami organizmu powoduje między innymi jonizację i wzbudzenie cząsteczek prowadzące do zmian konformacyjnych białek i utraty ich aktywności oraz utlenianie lipidów [Latanowicz i Latosińska 2000].

W pracy zbadano wpływ TPhPb oraz TPhT, DPhT, TBT i DBT na stopień utlenienia albuminy osocza krwi wołowej w obecności promieniowania UVB i bez tego promieniowania, wyrażonej w stężeniu wolnych grup tiolowych (-SH). Na rysunku 1 przedstawiono stężenie wolnych grup tiolowych albuminy (cztery pierwsze słupki, bez promieniowania UVB) inkubowanej przez dwie godziny w temperaturze pokojowej bez dodatku modyfikatorów (kontrola, K1) oraz z dodatkiem odpowiednio: chlorku TPhPb o stężeniu 50  $\mu\text{M}$  (oznaczenie Pb), troloxu o stężeniu 150  $\mu\text{M}$  (oznaczenie T) i mieszaniny troloxu z TPhPb (3:1), (oznaczenie T+Pb). Kolejne cztery słupki tego wykresu dotyczą kontroli (bez modyfikatora) oraz wpływu odpowiednio tych samych modyfikatorów na poziom utlenienia albuminy w obecności promieniowania UVB.

Jak wynika z danych przedstawionych na rysunku 1, chlorek TPhPb powoduje drastyczne zmniejszenie grup tiolowych albuminy (z wartości  $8,8 \pm 0,15\ \mu\text{M}$  SH do poziomu  $0,78 \pm 0,14\ \mu\text{M}$  SH co stanowi ok. 10% tych grup). Trolox, obecny w próbce wspólnie z TPhPb nie likwidował tego efektu zmniejszenia liczby grup tiolowych, a nawet nieznacznie je wzmacniał ( $0,37 \pm 0,05\ \mu\text{M}$  SH), natomiast sam trolox nie wpływał na zawartość grup tiolowych albuminy ( $8,49 \pm 0,37\ \mu\text{M}$  SH).



**Rys. 1.** Poziom grup tiolowych albuminy (wyrażony w  $\mu\text{M}$ ) indukowany chlorkiem tryfenylołowiu w stężeniu  $50 \mu\text{M}$  (Pb), troloxem w stężeniu  $150 \mu\text{M}$  (T) oraz mieszaniną tryfenylołowiu i troloxu (1:3) w obecności UVB i bez UVB. K1 i K2 – kontrole (albumina bez modyfikatora i bez UVB oraz w obecności UVB), (n= 18–4)

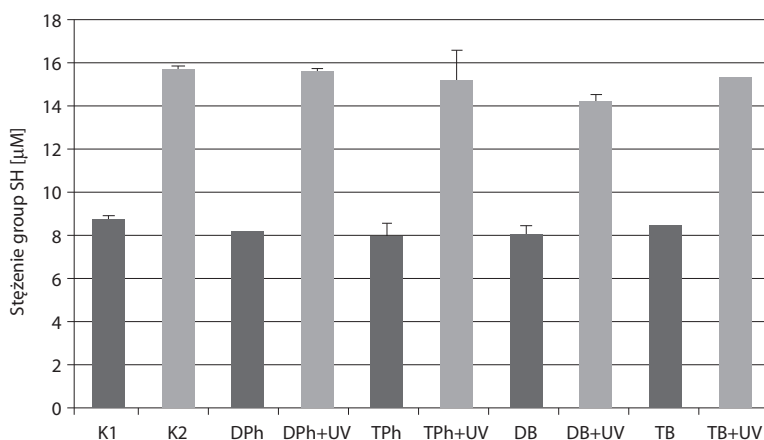
**Fig.1.** Level of albumin thiol groups (in  $\mu\text{M}$ ) induced by triphenyllead chloride at  $50 \mu\text{M}$  (Pb), trolox at  $150 \mu\text{M}$  (T) and the mixture of triphenyllead chloride with trolox (1:3) in the presence of UVB and without UVB. K1 i K2 – controls (albumin without modifier and without UVB and in the presence UVB), (n= 18–4)

Oddziaływanie chlorku TPhPb z albuminą skutkuje najprawdopodobniej tworzeniem połączeń (kompleksów) z grupami tiolowymi tego białka. Jest to zgodne z wcześniejszymi rezultatami badań, w których wykazaliśmy, że chlorek TPhPb wiąże się z grupami tiolowymi Na,K-ATPazy mózgu [Przestalski i in. 2000]. Istnieją także doniesienia, że organiczne związki cyny mogą się wiązać z białkami właśnie przez wiązania kowalencyjne pomiędzy atomem cyny a grupami tiolowymi obecnymi w białku [Stridh i in. 2001; Buck-Koehntop i in. 2006] jednakże są to najprawdopodobniej wiązania specyficzne. Wyniki naszych badań wskazują bowiem na brak wiązań pomiędzy grupami tiolowymi albuminy a związkami cyny, tj. TPhT, DPhT, TBT i DBT. Stężenie grup tiolowych (SH) w obecności wszystkich tych związków cyny (w stężeniu  $50 \mu\text{M}$ ) nie ulegało znaczącej zmianie w porównaniu z kontrolą ( $8,81 \mu\text{M}$  SH) i wahało się w granicach od  $8,04$  do  $8,53 \mu\text{M}$  SH (rys.2).

Różnorodną reaktywność organicznych form ołowiu i cyny w zdolności do tworzenia kompleksów w odniesieniu do alkilowych i fenylowych dichlorków tych związków ( $\text{R}_2\text{SnCl}_2$  oraz  $\text{Ph}_2\text{PbCl}_2$ ) zauważono dla przykładu w stosunku do chlorków fosfonioalkilowych, z którymi dichlorki alkilocyny tworzyły wiele kompleksów z wysoką wydajnością, a jedynie dichlorek fenylołowiu tworzył jedną, odmienną strukturę przestrzenną [Weber i in. 2004]. Obecność promieniowania UVB w warunkach doświadczenia (rys. 1) powodowała zna-

czący, ok. 80-procentowy, wzrost stężenia grup tiolowych w albuminie (oznaczenie K2). Wzrost ten należy tłumaczyć najprawdopodobniej faktem, że promieniowanie UVB powoduje zrywanie mostków disiarczkowych w albuminie, przyczyniając się do zmian strukturalnych białka. W obecności troloxu ten efekt nie był obserwowany, co sugeruje przypuszczenie o udziale wolnorodnikowych reakcji w tym procesie.

Chlorek TPhPb niweluje działanie promieniowania UVB, hamując powstawanie dodatkowych grup SH w wyniku zrywania mostków disiarczkowych. Nie jest wykluczone, że mógł to być rezultat kompleksowania przez TPhPb nowo powstających grup tiolowych. W warunkach naświetlania próbki w jednoczesnej obecności troloxu i TPhPb zaobserwowano znacznie większe zmniejszenie grup SH albuminy najprawdopodobniej w rezultacie synergicznego działania tych substancji.



**Rys. 2.** Poziom grup tiolowych albuminy (wyrażony w  $\mu\text{M}$ ) indukowany chlorkami METO: DPhT (DPh), TPhT (TP) DBT (DB) i TBT (TB) w stężeniu  $50 \mu\text{M}$  w obecności UVB i bez UVB. K1 i K2 – kontrole (albumina bez modyfikatora i bez UVB oraz w obecności UVB), ( $n = 18-4$ ).

**Fig. 2.** Level of albumin thiol groups (in  $\mu\text{M}$ ) induced by METO chloride at  $50 \mu\text{M}$ : DPhT (DPh), TPhT (TP) DBT (DB) i TBT (TB) in the presence of UVB and without UVB. K1 i K2 – controls (albumin without modifier and without UVB and in the presence UVB), ( $n = 18-4$ )

Podsumowując można stwierdzić, że oddziaływanie badanych chlorków METO z albuminą wiąże się najprawdopodobniej z działaniem organicznej formy ołowiu (TPhPb) na ugrupowania tiolowe tego białka natomiast nie mają wpływu na te ugrupowania organiczne formy cyny METO. Promieniowanie UVB powoduje zrywanie mostków disiarczkowych albuminy, które w obecności TPhPb jest niwelowane, najprawdopodobniej w wyniku tworzenia kompleksów z nowo powstałymi grupami SH.

**Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008–2011 (grant MNiSW) jako projekt badawczy no N N305 336434.**

## PIŚMIENNICTWO

- BRAGADIN M., MARTON D., SCUTARI D., DELL'ANTONE P. 2000. The interaction of trialkyltin compounds with lysosomes from rat liver. *J. Inorg. Biochem.* 78: 205–207.
- BRAGADIN M., MARTON D., MANENTE S., TONINELLO A. 2001. The interaction of tributyllead with lysosomes from rat liver. *J. Inorg. Biochem.* 83: 229–232.
- BRAGADIN M., MARTON D., MANENTE S. 2007. Trialkyllead compounds induce the opening of the MTP pore in rat liver mitochondria. *J. Inorg. Biochem.* 101: 876–878.
- BUCK-KOEHNTOP B.A., PORCELLI F., LEWIN J.L., CRAMER CH.J., VEGLIA G. 2006. Biological chemistry of organotin compounds: Interactions and dealkylation by dithiols. *J. Inorg. Biochem.* 691: 1748–1755.
- CHICANO J.J., ORTIZ A., TERUEL J.A., ARANDA F.J. 2001. Organotin compounds alter the physical organization phosphatidylcholine membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1510: 330–341.
- CHICANO J.J., ORTIZ A., TERUEL J.A., ARANDA F.J. 2002. Organotin compounds promote of non-lamellar phases in phosphatidylethanolamine membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1558: 70–81.
- CRAIG P.J. 1982. In *Organometallic Compounds In the Environment*, Verlag; Berlin, Part 13,8, Ausflage.
- COLOSIO C., TOMASINI M., CAIROLI S., FOÁ V., MINOIA C., MARINOVICH M., GALLI G.L. 1991. Occupational triphenyltin acetate poisoning: a case report. *British Journal of Industrial Medicine* 48: 136–139.
- GABRIELSKA J., SOCZYŃSKA-KORDALA M., HŁADYSZOWSKI J., ŻYŁKA R., MIŚKIEWICZ J., PRZESTALSKI S. 2006. Antioxidative effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposome membranes. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7735–7746.
- GABRIELSKA J., SOCZYŃSKA-KORDALA M., PRZESTALSKI S. 2004. Quercetin reduces prooxidant action of organometallic compounds on liposome membranes irradiated with UV. *Polish J. Environ. Stu.* 13: 509–514.
- GABRIELSKA J., PYRKOSZ K., PRZESTALSKI S. 2008. Rola albuminy w destrukcji błon liposomów indukowanej chlorkami tributyl- i trifenylocyny. *Błony biologiczne. Monografia*. Pod red. J. Gabrielska, P. Misiak, Wrocław: 169–173.
- HŁADYSZOWSKI J., GABRIELSKA J., ORDON P., PRZESTALSKI S., LANGNER M. 2002. Effect of steric constraints on the adsorption phenyltin compounds into liposome bilayer. *J. Mem. Biol.* 186: 1–11.

- LANGNER M., GABRIELSKA J., KLESZCZYŃSKA H., PRUCHNIK H. 1998. Effect of phenyltins compounds on lipid bilayer organization. *Appl. Organomet. Chem.* 12: 99–107.
- LATANOWICZ L., LATOSIŃSKA J.N. 2000. Promieniowanie ultrafioletowe a środowisko. Wyższa Szkoła Pedagogiczna im. T. Kotarbińskiego, Zielona Góra.
- LEVINER L., GARLAND D., OLIVER C.N. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzym.* 186: 464–478.
- MUSMECI M.T., MADONIA G., LO GUIDICE M.T., SILVESTRI A., RUISI G., BARBIERI R. 1992. Interactions of organotins with biological systems. *Appl. Organomet. Chem.* 6: 127–138.
- PETROSYAN Y.A., GRACHEVA V.Y., TYURIN E.V., GRIGORIEV E.A., MILAEVA L., PEL-LORITO. 2003. Effect of organotin compounds and their complexes with phosphatidylcholine on peroxide oxidation of lipid structural fragments. *Russian J. Organomet. Chem.* 39: 353–356.
- PRZYSTALSKI S., KLESZCZYŃSKA H., TRELA Z., SPIAK Z., ZAMARAEVA M., GLAZYRI-NA N., GAGELGANS A. 2000. Direct or indirect influence of triphenyl-lead on activity of Na,K-ATPase. *Appl. Organomet. Chem.* 14: 432–437.
- RAMSTOECK E.R., HOEKSTRA W.G., GANTHER H.E. 1980. Trialkyllead metabolism and lipid peroxidation *in vivo* in vitamin E and selenium-deficient rats, as measured by ethane production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54: 251–257.
- SANTRONI A.M., FEDELI D., GABBIANELLI R. 1997. Effect of organotin compounds on trout hemoglobins. *Biochem. Biophys. Res. Como.* 238: 301–304.
- SOCZYŃSKA-KORDALA M. 2004. Ochronna rola flawonoidów w działaniu czynników toksycznych na błony liposomów fosfatydylocholinowych. Praca doktorska, UP we Wrocławiu.
- TSUNODA T., IMURA T., KADOTA M., YAMAZAKI T., YAMAUCHI H., KWON K.O., YOKOYAMA S., SAKAI H., ABE M. 2001. Effect of lysozyme and bovine serum albumin on membrane characteristics of dipalmitoylphosphatidylglycerol liposomes. *Colloids Surf. B: Biointerface* 20: 155–163.
- WEBER D., HAUSNER S.H., EISENGRABER-PABST A., YUN S., KRAUSE-BAUER J., ZIMMER H. 2004. Unexpected differences in reactivity between tin and lead organyl chlorides-crystal structures of their organylphosphonium salts. *Inorg. Chimica Acta* 357: 125–134.