

ENZIMOHEMIJSKE I BIOHEMIJSKE PROMENE U JETRI PACOVA INDUKOVANE FURFURALOM

Dragana Veličković¹, Stevan Milenković² i Dalibor Stojanović²

U današnje vreme industrijske ekspanzije hemijskih proizvoda uloga jetre u organizmu je sve više značajna. Furfural (C_4C_3OCHO) je bezbojna tečnost prijatnog mirisa koja je delimično rastvorljiva u vodi (8, 3% od težine). Eliminacija furfurala vrši se sporo i u nepromenjenom obliku, putem bubrega i pluća, dok se u jetri oksidiše u piromucinsku kiselinu (C_4C_3OCOOH). Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) je multi komponentni sistem glukoneogeneze. Biohemijski parametri (AST, ALT, glukoza, γ -GT i alkalna fosfataza) bitni su markeri oštećenja jetre.

Cilj našeg istraživanja bila je analiza funkcije hepatocita preko biohemijskih parametara, sa prikazom dinamike i topografije nastajanja promena u enzimskoj aktivnosti.

Eksperiment je sproveden na pacovima Wistar soja starim 6 nedelja. Životinje su podeljene u tri grupe. Kontrolna je dobijala čistu pijaću vodu, druga grupa je sedam dana dobijala po 50 mg/kg TT furfurala a u trećoj su doze progresivno povećane. Nakon ispitivanja, životinje su žrtvovane. Biohemijskim metodama određeni su parametri oštećenja jetre. Za enzimohistohemijska ispitivanja pravljene su preseki debljine 8nm na kriostatu WKF 1150 a bojeni prema Pearsu (1968). Rezultati su prikazani na tabelama i grafički.

U kontrolnoj grupi su količina enzima i biohemijski parametri normalni. Aktivnost enzima difuzno je smanjena kod grupe tretirane 7 dana, a biohemijski parametri povećani. U grupi pacova tretiranih 90 dana, G6PD uvek je periportalno očuvana. Biohemijski parametri su promenjeni. Razlika je statistički značajna za sve parametre ($p < 0,05$) između grupe tretirane 7 dana i 90 dana. Isto je i kod kontrolne grupe i one tretirane 7 dana.

Kod akutnog tretiranja furfuralom dolazi do oštećenja funkcije jetre. Kod hroničnog testa dolazi do obnavljanja sintetske funkcije jetre. *Acta Medica Medianae* 2011;50(2): 34-38.

Cljučne reči: furfural, pacov, glukoza 6 fosfat dehidrogenaza, biohemijski parametri

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Institut za fiziologiju,
Niš, Srbija¹
Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Niš, Srbija²

Kontakt: Dragana Veličković
Institut za fiziologiju, Medicinski fakultet
Bul. dr Zorana Djindjića 81, 18000 Niš
E-mail: velickovicdr@gmail.com

Uvod

U današnje vreme industrijske ekspanzije hemijskih produkata, kao i upadljivog ekološkog zagađenja sredine, jetra je sve više značajna, jer se nalazi u najvećem broju slučajeva na putu njihove obrade (1). Da bi se u izvesnoj meri proširilo saznanje o detoksikacionoj ulozi jetre, analizirali smo metabolisanje određenih supstanci i time napravili uvid u neka od njenih funkcionalnih angažovanja (2). U tom cilju, interesantan je furfural, jer izaziva oštećenje hepatocita na indirektna način, tj. preko svog oksidativnog produkta piromucinske kiseline (3).

Furfural (furan-2-aldehid, C_4C_3OCHO) je prvi put dobijen 1840. godine destilacijom mekinja (lat. furfur) razređenom sumpornom kiselinom (4). Furfural je bezbojna tečnost prijatnog mirisa i delimično rastvorljiva u vodi (8, 3% od težine).

Značajna je njegova primena kao selektivnog rastvarača produkata mineralnih ulja, u hemiji, u gumarskoj industriji, plastičnoj hirurgiji i industriji polimera (5). Pored toga, ima ga i u soku od pomarandže, brendiju (6) i japanskom sakiju (7). Zbog lake isparljivosti, prodiranja u tkiva i relativno lake akumulacije izaziva glavobolju, nauzeju, povećano lučenje pljuvačke, suza, laringitis i alergijske promene na koži (8). U organizmu furfural nastaje dihidratacijom pentoza (9), tako da je njegova pojava u urinu fiziološka.

Eliminacija furfurala vrši se sporo i u nepromenjenom obliku putem bubrega i pluća. U jetri se obavlja njegova oksidacija u piromucinsku kiselinu (C_4C_3OCOOH), koja je toksična za hepatocite, ali se konjuguje sa glicinom i najvećim delom ekskretuje urinom (10, 11).

Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) je multi komponentni sistem smešten sa luminalne strane endoplazmatskog retikuluma i sastavljen je iz pet različitih polipeptida: Glukoza-6-fosfat enzim sa Ca²⁺- vezujućim proteinom i tri transportna proteina (T₁, T₂, T₃). Glavni je enzim glukoneogeneze, koja oslobađa glukozu za periferna tkiva ili sintezu glikogena. Najveću aktivnost ima periportalno. G6PD je bitna karika i u pentoznom ciklusu, koji stvara pentoze neophodne za rast, jer ulaze u sastav DNK i RNK (12).

Jetrine transaminaze sGOT (AST) i sGPT (ALT) bitni su markeri oštećenja jetre i rutinski se rade u savremenim laboratorijama. Takođe, glukoza, γ -GT i alkalna fosfataza (AF) povećavaju se u slučajevima kad dolazi do oštećenja jetrinog parenhima pod dejstvom mnogobrojnih štetnih noksi koje se svakodnevno detoksikuju u jetri (13).

Cilj

Cilj našeg istraživanja bio je:

1. Praćenje aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze histohemijskom analizom hepatocita, sa prikazom dinamike i topografije nastajanja promena pod uticajem furfurala.

2. Utvrđivanje odnosa jetrinih transaminaza, γ -GT i glukoze u različitom vremenskom intervalu tretiranja furfuralom primenom klasičnih biohemijskih metoda u krvi.

Materijal i metode

Pri ispitivanju, korišćeni su pacovi Wistar soja tt.(150g-200g) stari šest nedelja. Za tretiranje je korišćen furfural (2-furaldehide C₄H₃OCHO) firme „Sigma Chemical Co.,“. Furfural je dat životinjama u vodi za piće.

Životinje smo podelili u tri grupe:

Prva grupa služila je kao kontrola i sastojala se od deset životinja.

Druga grupa od 10 životinja dobijala je po 50 mg/kg TT furfural u pijaćoj vodi sedam dana.

Treća grupa životinja dobijala je furfural po 30 mg/kg TT prvih 30 dana, od 31. do 60. dana po 40 mg/kg TT a od 61. dana do kraja eksperimenta po 50 mg/kg TT.

Životinje navedenih grupa bile su žrtvovane abdominalnom eksangvinacijom posle jednog dana od date poslednje doze. Neposredno pre žrtvovanja uzimana je krv iz abdominalne aorte.

Klasičnim biohemijskim metodama u krvi određeni su AST, ALT, γ -GT i glukoza.

Za enzimohistohemijska ispitivanja od svežih uzoraka jetre serijski su pravljene presece debljine 8 nm na kriostatu WKF 1150, pri temperaturi od -20° C, a bojeni prema Pearsu (1968), radi praćenja topografske zonalne aktivnosti (periferna, intermedijerna, centralna) glukoza-6-fosfat dehidrogenaze.

Rezultati istraživanja su sistematizovani i prikazani tabelarno i grafički (Excel 2003, Word

2003), a obrađeni statističkom metodom deskriptivne i kvantitativne analize (SPSS 14.0 for Windows 2003). Poređenje učestalosti atributivnih obeležja vršeno je χ^2 -testom. Vrednosti $p < 0,05$ interpretirane su kao statistički značajne.

Rezultati

1. Kontrolna grupa

Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza je svojom aktivnošću prisutna difuzno u citoplazmi hepatocita svih zona. Enzimski aktivnost je najjače izražena periferozonalno (+++), tako da je citoplazma hepatocita centrozonalno i intermediozonalno bogata zrnastim materijalom, da bi prema periferiji količina istog bivala manja (Slika 1).

Vrednosti AST, ALT, γ -GT, alkalne fosfataze i glukoze su u granicama normale (Tabela 1).

2. Prva eksperimentalna grupa (7 dana po 50mg/kg TM)

Aktivnost G6PD je difuzno smanjena. U hepatocitima očuvanih kontura prisutna je njena slaba aktivnost u citoplazmi (Slika 2).

Vrednosti AST, ALT, γ -GT i glukoze drastično su povećane, dok su vrednosti alkalne fosfataze u granicama normale (Tabela 1).

3. Druga eksperimentalna grupa (90 dana po 50 mg/kg TM)

G6PD se pojavljuje multifokalno, uvek periportalno, a često u vidu portoportane "bridging" formacije. Enzimski polimorfizam je evidentan i kreće se od jake (+++), preko srednje (++) , slabe (+), do potpune neaktivnosti u nekrotičnim poljima (Slika 3).

Aktivnost AST, ALT i γ -GT je u porastu, koji je u odnosu na prethodnu podgrupu mali, ali u odnosu na kontrolnu izrazit. Pad vrednosti glukoze i AF nastavlja se u odnosu na vrednosti prethodnih grupa (Tabela 1).

Upoređivanjem vrednosti rađenih parametara iz krvi uočava se statistički značajna ($p < 0,05$) razlika istih kod kontrolne grupe i grupe tretirane furfuralom sedam dana po 50 mg/kg TM (Grafik 1).

Vrednosti grupe tretirane 7 dana i grupe tretirane 90 dana pokazuju veliki pad kod hroničnog tretiranja furfuralom (grafik 1). Razlika je statistički značajna za sve parametre ($p < 0,05$).

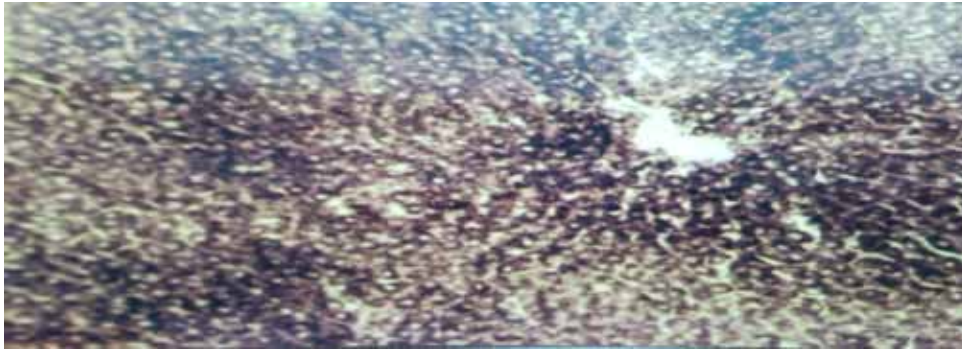
Komparacijom rezultata kod kontrolne grupe i hroničnog testa razlika je statistički značajna ($p < 0,05$) za AST, γ -GT i alkalnu fosfatazu, dok to nije slučaj kod glukoze i ALTa ($p > 0,05$).

Diskusija

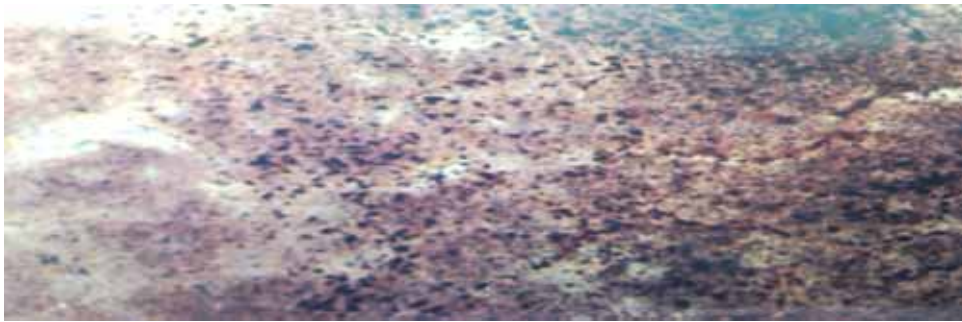
Jetra ima mnogo važnih i raznovrsnih funkcija, uključujući procese sinteze enzima i strukturnih proteina, detoksikaciju mnogih unutrašnjih i spoljašnjih produkata organizma (14). Za te funkcije hepatociti koriste enzimski sisteme koji su uglavnom oko 60% lokalizovani u mitohondrijama. Furfural nije štetan, već njegov nus produkt, piromucinska kiselina, koja nastaje oksidacijom, kasnije se konjuguje glicinom i izlučuje urinom (15).

Tabela 1. Prikaz vrednosti glukoze, AST, ALT, γ -GT i alkalne fosfataze kod kontrolne i dve grupe eksperimentalnih životinja

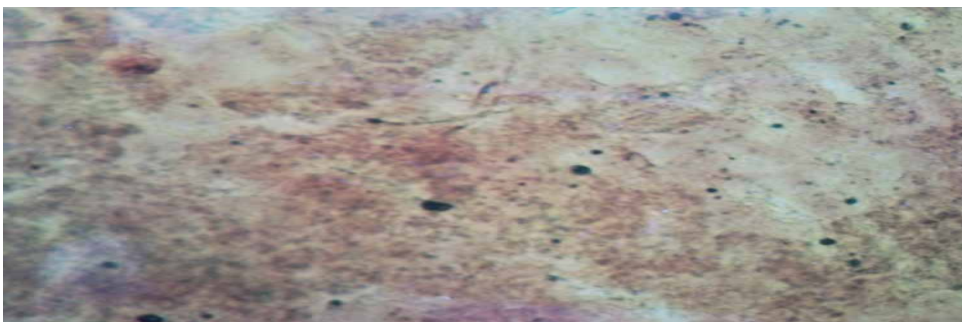
	Kontrola	Posle 7 dana	Posle 90 dana
	\pm SD (mmol/l)	50 mg/kg	50mg/kg
Glukoze	6.2 \pm 1.1	10.4 \pm 1.7	6.9 \pm 0.8
sGOT (AST)	91.88 \pm 2.77	143 \pm 2.5	98 \pm 1.3
sGPT (ALT)	12.7 \pm 1.25	39 \pm 1.2	22 \pm 0.6
γ - GT	6.8 \pm 3.2	39 \pm 0.2	15 \pm 1.4
AF	124.2 \pm 15.4	124 \pm 0.5	111 \pm 1.6



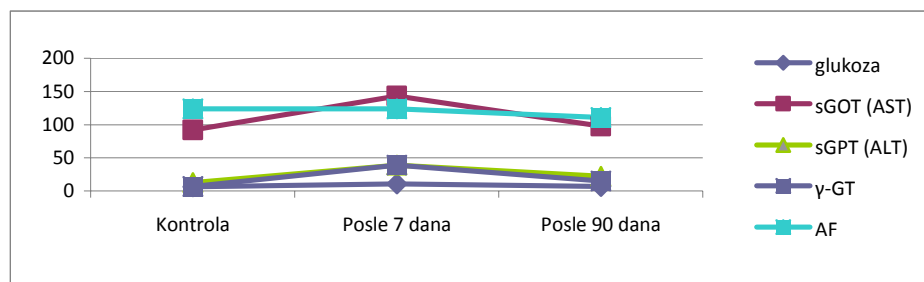
Slika 1. Aktivnost G6PD u jetri pacova kod kontrolne grupe



Slika 2. Aktivnost G6PD u jetri pacova kod prve eksperimentalne grupe



Slika 3. Aktivnost G6PD u jetri pacova kod druge eksperimentalne grupe

Grafik 1. Prikaz vrednosti biohemijskih parametara (glukoza, AST, ALT, γ -GT, AF) u krvi pacova

U našim eksperimentalnim uslovima depoi glikogena se postepeno smanjuju, tako da ih kod hroničnog tretiranja skoro nema. Gubitak glikogena implicira depresiju detoksikacione funkcije hepatocita (16). Ove promene u vrednosti glikogena dovode do poremećaja u enzimskom sistemu (17). Naime, progresivno smanjenje G6PD u hepatocitima, od periferije ka centru lobulusa, sa dužim vremenom tretiranja, može se povezati sa deplecijom količine glukagona (13,18). Ovi rezultati drugih istraživača slažu se sa rezultatima našeg istraživanja da je aktivnost G6PD najjača perivenularno zbog blizine krvnog suda, dok to nije slučaj sa onim hepatocitima koji su periportalno (19). Naša istraživanja ukazuju na difuzno smanjenje G6PD u prvoj eksperimentalnoj grupi, dok su u grupi pacova tretiranih 90 dana prisutna područja areaktivnosti, koja su više izražena u periportalnom delu. Ove promene u proizvodnji energije označavaju se kao funkcionalna insuficijencija jetre (20), što dokazuje brza obnova ispitivanog enzima.

Značajan parametar jetrinog oštećenja je pojava povećane enzimске aktivnosti u serumu (21). Promene nastale u serumskim vrednostima pojedinih laboratorijskih parametara (glikoza, AST, ALT, γ -GT, alkalna fosfataza) mogu se tumačiti: prvo, pojačanim raspadnim procesom u hepatocitima, drugo, insuficijencijom enzima jetre koji je potreban da bi se suprotstavio pojačanim metaboličkim potrebama (22,23). U prvoj grupi se vidi značajno povećanje transaminaza, γ -GT, alkalna fosfataza, glikoza. Povećanje je indukovano pove-

ćanom permeabilnošću ćelijske membrane zbog njenog oštećenja (24). Kod hroničnog tretiranja uočava se blaga normalizacija rezultata u odnosu na vrednosti kod akutnog tretiranja. Ovaj oporavak rezultat je očuvanih reparativnih mehanizama hepatocita (25).

Zaključak

Furfural nije toksičan, već njegov derivat piromucinska kiselina ($C_4H_3O_3COOH$), koja se u jetri konjuguje sa glicinom i najvećim delom ekskretuje urinom.

Smanjenje aktivnosti glukozo-6-fosfat dehidrogenaze u periportalnom delu jetre objašnjava se blizinom krvnog suda, jer to područje prvo dolazi u kontakt sa furfuralom i vrši detoksikaciju. U permanentno funkcionalnoj zoni (periferozonalno) dolazi do pada nivoa glikogena, što se objašnjava procesom obnove energije jetrinih ćelija i stvaranjem glicina neophodnog za detoksikaciju metabolita furfurala.

Kod tretiranja dozom od 50 mg/kg TM furfuralom dolazi do oštećenja normalne funkcije jetre, a dokaz je porast biohemijskih parametara za oštećenja jetre i izrazit pad aktivnosti G6PD.

Kod postepenog povećanja doze furfurala od 30 do 50 mg/kg TM u toku 90 dana dolazi do obnavljanja sintetske funkcije jetre, što se manifestuje normalizacijom biohemijskih parametara.

Literatura

- Castellino N, Elmino O, Rozera G. Experimental research on toxicity of furfural. Arch Environ Health 1963; 7: 547-82. [\[PubMed\]](#)
- Agakishiyev DD, Shumarina VN. An experimental study of the photodynamic properties of furfural and of the potentials for using a photoprotective cream. Vestn Dermatol Venerol 1990;(4): 20-5. Article in Russian. [\[PubMed\]](#)
- Flek J, Sedivec V. The absorption, metabolism and excretion of furfural in man. Int Arch Occup Environ Health 1978; 41: 159-68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Adams TB, Doull J, Goodman JI, Munro IC, Newberne P, Portoghese PS, et al. The FEMA GRAS assessment of furfural used as a flavour ingredient. Flavor and Extract Manufacturers' Association. Food Chem Toxicol 1997; 35(8):739-51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Begic-Janeva AZ. Patologija jetre, zucne besike i zucnih vodova. Decje novine, Gornji Milanovac, 1991.
- Blitzer BL, Boyer JL. Cellular mechanisms of bile formation. Gastroenterology 1982; 82: 346-57. [\[PubMed\]](#)
- Higashi T. On some constituents of Sake. Sci Pap Inst Phys Chem Res 1937; 33: 1-129.
- Kuznetsov PJ. Toxicological characteristics of furfural. Parts I and II. Tr Omak Med Inst 1966; 69: 38-44.
- Petković M. Hemija biomolekula III, Univerzitet u Nišu, 1990.
- Maruyama H, Amanuma T, Takashima Y, Yoshiji H, Nakae D, Tsutsumi M, et al. Possible enhancing effect of the immunosuppressive agent, 6-mercaptopurine(6-MP) on focal lesion development in cirrhotic liver induced by carbon tetrachloride but not furfural in F344 rats. Carcinogenesis 1992; 13(8): 1365-9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Shimizu A, Kanisawa M. Experimental studies on hepatic cirrhosis and hepatocarcinogenesis. Production of hepatic cirrhosis by furfural administration. Acta Pathol Jpn 1986; 36(7):1027-38. [\[PubMed\]](#)
- Blitzer BL, Ratoosh SL, Donovan CB, Boyer JL. Effects of inhibitors of Na⁺-coupled ion transport on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Am J Physiol. 1982; 243(1): G48-53. [\[PubMed\]](#)
- Divald A, Jeney A, Nagy OJ, Timar F, Lapis K. Modification of the inhibitory effects of CCl₄ on phospholipid and protein biosynthesis by prostacyclin. Biochem Pharmacol 1990; 40: 1477-83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Koracevic D, Bjelakovic G, Djordjevic V, Nikolic J, Kocic G. Medicinska biohemija. Univerzitet u Nisu, 1996.
15. Parkash KK, Caldvell J. Metabolism and excretion of S12Cc furfural in the rat and mouse. *Food Chem Toxicol* 1994; 32(10): 887-95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Draper AJ, Madan A, Parkinson A. Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1997; 341(1): 47-61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Janzowski C, Glaab V, Samimi E, Schlatter J, Eisenbrand G. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem Toxicol* 2000; 38(9): 801-9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lake BG, Edwards AJ, Price RJ, Phillips BJ, Renwick AB, Beamand JA, et al. Lack of effect of furfural on unscheduled DNA synthesis in the in vivo rat and mouse hepatocyte DNA repair assays and in precision-cut human liver slices. *Food Chem Toxicol* 2001; 39(10): 999-1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Uddin S, Hadi SM. Reactions of furfural and methyl furfural with DNA. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35(1): 185-95. [[PubMed](#)]
20. Velvart J, Boizik L, Michalcakova H. Health condition of workers employed in the production of furfural. *Prac Lek* 1962; 14: 186-9. Article in Czech. [[PubMed](#)]
21. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G, Nikolić J, Cvetković T, Stojanović I, et al. Klinička biohemija. Grafika Galeb, Niš, 2010.
22. Kostić V, Trifunović G, Đorđević M, Jovanović B, Đorđević J, Radović J et al. Hepatitis toxica – case report. *Acta Medica Medianae* 2009;48(2):49-51
23. Velickovic D. Promene u jetri indukovane furfuralom. Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, 1997.
24. Koura T, Kaneko S, Matsushita E, Ohno H, Kaji K, Kobayashi K. Investigation of albumin-synthesizing ability in rat cirrhotic liver-derived hepatocytes using primary hepatocyte culture. *J Hepatol* 1999; (2):293-9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nagorni A, Stamenković I, ed. Bolesti jetre, Interna medicina-Gastroenterologija, Galaksija, Niš, 2009.

ENZYMOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN THE LIVER OF RATS INDUCED BY FURFURAL

Dragana Veličković, Stevan Milenković and Dalibor Stojanović

In today's industrial expansion of the chemical products, the liver is becoming increasingly important. Furfural (C₄H₃OCHO) is a colorless liquid with pleasant aroma and it is partially soluble in water (8, 3% of weight). The elimination of furfural is done slowly through the kidneys and lungs, while the liver oxidizes it into pyromucic acid (C₄H₃O₂COOH). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is a multi-component system of gluconeogenesis. Biochemical parameters (AST, ALT, glucose, γ -GT and alkaline phosphatase) are important markers of liver damage.

The aim of our study was to analyze the function of hepatocytes using biochemical parameters and to show the dynamics and topography in the development of changes in enzyme activity.

The experiment was conducted on Wistar rats aged 6 weeks. The animals were divided into three groups. The control group received pure drinking water, the second group received a 50 mg/kg body weight (BW) dose of furfural for seven days and in the third group the dose was progressively increased after which the animals were sacrificed. Biochemical methods were used to determine the parameters of liver damage. Enzyme-histochemical tests were performed on 8nm WKF 1150 cryostat cross sections which were stained according to Pearse (1968). The results are presented tables and graphs.

The amount of enzymes and biochemical parameters in the control group were normal. In the group treated for 7 days, the activity of the enzymes was diffusely decreased while the biochemical parameters were increased. In the group of rats treated for 90 days, the periportal G6PD was constantly preserved. Biochemical parameters were different. The differences in all parameters were statistically significant ($p < 0.05$) both in the group treated for 7 days and the group treated for 90 days. The same goes for the control group and the group treated for 7 days.

Acute treatment with furfural causes damage to liver functions. The synthetic liver function is restored in chronic tests. *Acta Medica Medianae* 2011;50(2):34-38.

Key words: furfural, rat, glucose-6-phosphate dehydrogenase, biochemical parameters