

Maria Jedlińska-Krakowska

WPLYW KADMU I OŁOWIU ORAZ WITAMINY E I C NA POZIOM WYBRANYCH WSKAŹNIKÓW OKSYDACYJNYCH I BIOCHEMICZNYCH U SAMCÓW SZCZURÓW

Katedra Patofizjologii Weterynarii Sądowej i Administracji Wydziału Medycyny
Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Kierownik: dr hab. *A. Kowalski*, prof. UWM

W pracy przedstawiono wpływ kadmu i ołowiu na wybrane wskaźniki biochemiczne i oksydacyjne u samców szczurów. Sprawdzono również, w jakim stopniu witaminy E i C są w stanie zapobiec ewentualnym zmianom patologicznym, wywołanym przez oba metale.

Hasła kluczowe: kadm, ołów, witamina E, witamina C, stres oksydacyjny, szczury.
Key words: cadmium, lead, vitamin E, vitamin C, oxidative stress, rats.

Pośród metali ciężkich można wyróżnić pierwiastki niezbędne dla funkcjonowania organizmów żywych, tzw. mikroelementy, jak również pierwiastki o nieznannej roli fizjologicznej, które przeważnie wywierają nań działanie toksyczne. Do takich metali należy m.in. kadm (Cd) i ołów (Pb). Stanowią one składnik chemicznych zanieczyszczeń środowiska, łatwo przenikają przez błony komórkowe, mają zdolność kumulowania się w wielu narządach i wywierania wielokierunkowych, często oddalonych w czasie zmian chorobowych. Zarówno Cd, jak i Pb pomimo, że nie są aktywne w reakcjach redox, zmieniają wewnątrzkomórkowy status oksydacyjny, stymulując powstawanie w organizmie stresu oksydacyjnego (SO), w wyniku czego dochodzi do nasilenia peroksydacji lipidów, uszkodzenia białek, DNA, zmian w ekspresji genów i procesach apoptozy (1, 2, 3). Na zasadzie interakcji Cd zmienia metabolizm cynku, miedzi, żelaza i selenu, co zaburza funkcje regulacyjne oraz powoduje zmiany morfologiczne i czynnościowe w poszczególnych narządach (4).

Celem pracy było określenie, czy podawanie metali wraz z łatwo dostępnymi związkami o charakterze przeciwutleniaczy takimi, jak witamina E i C, jest w stanie zapobiec ewentualnym zmianom wybranych wskaźników oksydacyjnych i biochemicznych w narządach.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 72 szczurach samcach szczepu *Wistar/Hannover*, o średniej masie ciała 350 g i wieku 5 miesięcy. Zwierzęta zostały losowo podzielone na 12 grup, oznaczonych następującymi skrótami (w każdej n = 6): (K) – zwierzęta kontrolne; (Cd) – zwierzęta otrzymujące kadm w destylowanej wodzie do

picia w ilości 30 mg/dm³ (chlorek kadmu CdCl₂ x 2.5 H₂O cz.d.a. – POCH S.A. Gliwice); (Pb) – zwierzęta otrzymujące ołów w destylowanej wodzie do picia w ilości 30 mg/dm³ (octan ołowiu Pb(CH₃COO)₂ x 3 H₂O cz.d.a. – POCH S.A. Gliwice); (CdPb) – zwierzęta otrzymujące oba pierwiastki w ilościach podanych wyżej; (CdC) – szczury otrzymujące kadm oraz witaminę C w postaci iniekcji domięśniowych w ilości 10 mg/szczura co 5 dni (Vitaminum C, Pliva, Kraków); (PbC) – szczury otrzymujące ołów oraz witaminę C (j.w.); (CdPbC) – szczury otrzymujące oba te pierwiastki i witaminę C; (CdE) – szczury otrzymujące kadm oraz witaminę E (10 mg/szczura) z selenem (0,1 mg/szczura) w postaci iniekcji domięśniowych co 5 dni (VIT. E50+SE, Novartis, Holandia); (PbE) – szczury otrzymujące ołów oraz witaminę E z Se (j.w.); (CdPbE) – szczury otrzymujące oba te pierwiastki i witaminę E z Se; (C) i (E) – zwierzęta otrzymujące odpowiednio tylko iniekcje witaminy C lub E (j.w.).

Po zakończeniu doświadczenia (po 25 dniach) od wszystkich szczurów, będących w narkozie halotanowej (Narcotan, Leciva Czechy), pobrano maksymalną ilość krwi metodą punkcji serca, aż do całkowitego skrwawienia zwierzęcia. W pełnej krwi, zaraz po jej pobraniu, oznaczono aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) (5). Pozostała krew odwirowano w temp. 4°C przez 10 min. przy 3000 obr./min., a oddzielone osocze do czasu przeprowadzenia oznaczeń zamrożono w temp. –22°C. Bezpośrednio po skrwawieniu zwierzęcia wycinano fragmenty wątroby, serca, nerek, płuc oraz gonad w celu oznaczenia w nich koncentracji dialdehydu malonowego (MDA) (6). MDA oznaczano w 20% homogenacie w/w tkanek w płynie fizjologicznym. W osoczu krwi określono koncentrację MDA, kwasu moczowego, białka całkowitego, kreatyniny, cholesterolu i glukozy oraz aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST) (zestawy diagnostyczne Pointe Scientific Polska sp. z o.o.)

W ciągu 25 dni trwania doświadczenia przeciętne spożycie wody wynosiło w grupie (K) ok. 35 cm³/szczura na dobę, w grupach (Cd), (CdE), (CdC) (CdPb), (CdPbE) i (CdPbC) ok. 40 cm³, a w grupach (Pb), (PbE) i (PbC) – ok. 45 cm³, co oznacza, że przeciętna dawka kadmu pobranego przez szczura wynosiła 1,2 mg/dobę, ołowiu – 1,35 mg/dobę, zaś kadm i ołów łącznie – po 1,2 mg obu tych pierwiastków.

Statystyczne opracowanie wyników obejmowało wyliczenie średnich arytmetycznych, błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotności różnic w stosunku do grupy kontrolnej (test *t*-Studenta).

Badania na zwierzętach wykonano zgodnie z wytycznymi ustawy „O Ochronie Zwierząt” i zaleceniami Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy UWM w Olsztynie (zezwoleń nr 40/2009/N).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Łączne podawanie szczurom kadmu i ołowiu w wodzie do picia spowodowało istotny statystycznie wzrost aktywności GPx w osoczu, w stosunku do grupy kontrolnej. Podobne zmiany zaobserwowano w grupach zwierząt otrzymujących Cd i Pb łącznie z witaminą C. Z kolei oba te metale, ale stosowane osobno i bez osłony witaminowej nie wykazywały wpływu na aktywność tego enzymu (tab. I).

Tabela 1. Poziom wskaźników biochemicznych i GPx we krwi szczurów (\pm SEM)
 Table 1. Levels of biochemical indices and GPx in rat blood (\pm SEM)

Grupa	Kwas moczowy (nmol/dm ³)	Białko całkow. (g/dm ³)	Kreatynina (nmol/dm ³)	Glukoza (mmol/dm ³)	Cholesterol (mg/dl)	ALT (U/dm ³)	AST (U/dm ³)	GPx (U/dm ³)
K	195 \pm 13,7	52,46 \pm 1,18	25,9 \pm 1,18	7,02 \pm 0,16	51,14 \pm 1,69	28,8 \pm 0,41	89 \pm 14,5	1418 \pm 58
Cd	197 \pm 6,57	53,67 \pm 1,63	22,9 \pm 0,98	7,17 \pm 0,4	49,14 \pm 1,89	26,3 \pm 2,01	91,8 \pm 13,49	1492 \pm 48
Pb	209 \pm 2,61	60,78** \pm 2,56	25,4 \pm 2,12	6,92 \pm 0,32	49,28 \pm 1,45	28,4 \pm 3,92	86,5 \pm 4,64	1529 \pm 95
CdPb	196 \pm 4,28	57,39 * \pm 1,96	22,1 \pm 1,43	7,22 \pm 0,13	47,18 \pm 2,46	21,8 \pm 1,35	102,2 \pm 11,45	1663** \pm 52
CdC	225 \pm 7,06	52 \pm 1,96	25,5 \pm 1,96	7,09 \pm 0,22	52,6 \pm 2,45	36,3 \pm 4,08	93,42 \pm 11,18	1799** \pm 52
PbC	219 \pm 13,1	48,9 \pm 1,14	23,7 \pm 3,47	8,27 \pm 0,24	53,8 \pm 0,84	31,2 \pm 2,57	90,6 \pm 11,18	1763** \pm 85
CdPbC	194 \pm 4,12	53,2 \pm 2,37	21,4 \pm 3,14	7,62 \pm 0,47	56,1 \pm 2,2	28,6 \pm 2,57	103,2 \pm 17,47	1900** \pm 13
CdE	216 \pm 5,27	56,4 \pm 3,39	25,8 \pm 6,98	7,66 \pm 0,19	47,8 \pm 2,94	35 \pm 4,09	173,4* \pm 70	1336 \pm 67
PbE	230 \pm 5,27	49,3 \pm 2,53	23,7 \pm 2,28	8,27 \pm 0,25	55,2 \pm 2,57	27,4 \pm 4,11	174,8* \pm 29,63	1047* \pm 22
CdPbE	218 \pm 4,89	53,8 \pm 2,24	21,5 \pm 1,76	9,18* \pm 0,31	54,3 \pm 2,94	30,7 \pm 3,06	163,2* \pm 24,41	1399 \pm 74
C	193 \pm 3,96	50,1 \pm 1,76	22,7 \pm 2,41	8,23 \pm 0,21	47,9 \pm 3,39	35,7 \pm 3,47	114,2 \pm 21,43	1512 \pm 86
E	216 \pm 2,94	57,0 \pm 4,04	21,9 \pm 3,22	9,47* \pm 0,32	56,3 \pm 4,82	29 \pm 1,47	97,7 \pm 4,12	1235 \pm 80

Objaśnienia: * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01 w porównaniu do grupy kontrolnej.

W grupach doświadczalnych otrzymujących Cd i Pb wraz z witaminą E wzrosła aktywność AST, zaś u zwierząt z grup (CdPbE) i (E) – poziom glukozy (tab. I).

Łączne podawanie Cd i Pb oraz obu metali wraz z wit. C spowodowało podwyższenie poziomu MDA w nerkach i wątrobie, natomiast oba metale podawane łącznie, ale bez osłony witaminowej, zwiększały jego koncentrację w płucach (tab. II). Zarówno Cd, jak i Pb oraz oba te pierwiastki podawane łącznie z wit. C podwyższyły stężenie MDA w jądrach, czego nie obserwowano przy stosowaniu wraz z nimi wit. E. Poziom dialdehydu malonowego wzrósł także w sercu w grupie (Pb) oraz w osoczu w grupach (Cd), (CdPbC) i (C). Z kolei iniekcje samej wit. E obniżyły koncentrację MDA w sercu i w osoczu, w stosunku do grupy (K) (tab. II).

Tabela II. Poziom MDA w tkankach i w osoczu (\pm SEM)

Table II. MDA levels in tissues and blood plasma (\pm SEM)

Grupa	Serce ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	Nerki ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	Wątroba ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	Jądra ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	Płuca ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	Osocze ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)
K	3,12 \pm 0,21	3,78 \pm 0,26	3,63 \pm 0,14	5,24 \pm 0,69	4,88 \pm 0,2	9,1 \pm 0,55
Cd	3,2 \pm 0,12	4,01* \pm 0,35	3,2 \pm 0,2	5,28* \pm 0,64	5,27 \pm 0,22	10,20* \pm 0,35
Pb	3,82* \pm 0,14	4,18* \pm 0,28	3,65 \pm 0,09	4,07** \pm 0,96	5,02 \pm 0,11	10,32 \pm 0,06
CdPb	4,06* \pm 0,21	4,43** \pm 0,29	3,82 \pm 0,22	5,92* \pm 0,86	5,21* \pm 0,09	12,0* \pm 0,09
CdC	3,7 \pm 0,33	4,88* \pm 0,17	4,11* \pm 0,25	7,91* \pm 1,27	4,65 \pm 0,2	9,29 \pm 0,4
PbC	3,93 \pm 0,13	4,84* \pm 0,13	4,68* \pm 0,18	8,04** \pm 0,48	4,92 \pm 0,09	9,29 \pm 0,46
CdPbC	4,96 \pm 0,19	5,62** \pm 0,28	5,01** \pm 0,34	8,32** \pm 0,85	5,00 \pm 0,33	11,23* \pm 0,47
CdE	3,99 \pm 0,14	4,22 \pm 0,09	3,77 \pm 0,13	4,43 \pm 0,41	4,56 \pm 0,37	9,90 \pm 0,86
PbE	3,97 \pm 0,16	4,18 \pm 0,22	3,34 \pm 0,17	4,43 \pm 0,11	4,52 \pm 0,32	9,84 \pm 0,29
CdPbE	4,15 \pm 0,09	2,59* \pm 0,18	3,52 \pm 0,05	4,94 \pm 0,29	4,98 \pm 0,18	9,27 \pm 0,18
C	4,99 \pm 0,15	5,78** \pm 0,23	3,91 \pm 0,21	5,55 \pm 0,85	4,71 \pm 0,14	10,11* \pm 0,09
E	2,98** \pm 0,11	3,12 \pm 0,06	3,46 \pm 0,07	5,83 \pm 0,5	4,63 \pm 0,19	7,18* \pm 0,32

Objaśnienia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wiadomo jest, że Cd i Pb kumulują się w organizmie działając toksycznie na wątrobę, nerki, płuca, serce, jądra, czy układ nerwowy (3, 7). W takich samych warunkach Pb najsilniej uszkadza nerki, serce i jądra, a w najmniejszym stopniu wątrobę i płuca (tab. II). Może to wynikać m.in. ze specyfiki narządowej oddziaływania ołowiu wynikającej z obecności białka wiążącego ołów, którego syntezę stymuluje również sam Pb (3, 8). Przy podobnych zmianach we wskaźnikach stresu oksydacyjnego, w wątrobie, w przeciwieństwie do nerek, nie zaobserwowano również żadnych zmian histopatologicznych (9, 10). Świadczy to o tym, iż SO nie jest jedynym elementem toksyczności ołowiu (9, 10). Pomimo tego, że zarówno Cd, jak i Pb indukują w wątrobie SO, łączne podawanie obu metali nie zwiększa jego nasilenia, w porównaniu do ich podawania pojedynczo (tab. II). Według *Dagget* i *Sabolić*, gdy występują one w podobnej koncentracji, kadm wydaje się być bardziej toksyczny (10, 11). Z kolei w jądrach, SO, bez względu na jego przyczynę powoduje zmiany w przepływie krwi, przesyłaniu sygnałów endokrynych i procesach apoptozy (12).

Cd i Pb uszkadzają mitochondria komórek *Sertoliego*, zwiększają peroksydację lipidów w płynie nasiennym i w samych plemnikach (13, 14), czemu towarzyszy wzrost poziomu MDA, również w grupach otrzymujących witaminę C (tab. II).

Zwiększoną koncentrację MDA zaobserwowano również w sercu u szczurów z grup (Cd) i (CdPb). Ponieważ jednym z mechanizmów oddziaływania ołowiu na status oksydacyjny jest hamowanie syntezy tlenu azotu, regulującego pośrednio wykorzystanie tlenu w mitochondriach, tak więc przy spadku jego poziomu wzrasta ryzyko uszkodzeń serca i schorzeń układu krążenia (15), powodowanych m.in. przez SO.

Zarówno kadm, jak i ołów obniżają ogólną pojemność antyoksydacyjną organizmu. Jednocześnie, zaburzając metabolizm selenu, metale te, głównie kadm, wpływają na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w których Se stanowi składnik centrum aktywnego. Są to tzw. enzymy naprawcze, tworzące trzecią, ostatnią linię obrony, którą jest likwidacja uszkodzeń już powstałych w wyniku działania ROS (16). Do tych enzymów należy m.in. peroksydaza glutationowa, której aktywność wzrosła najbardziej w grupach (CdPb), (CdC), (PbC) i CdPbC (tab. I). Podawanie witamin E i C w niejednakowym stopniu zapobiegało skutkom SO. Witamina E obniżała koncentrację MDA niemal we wszystkich grupach doświadczalnych, czasem nawet poniżej wartości obserwowanych u zwierząt kontrolnych. Działając w charakterze wychwytywacza-pułapki wolnych rodników zatrzymuje ona proces autooksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, stabilizując błonowe fosfolipidy, jak również białka wewnątrz- i pozakomórkowe (17, 18). Z kolei witamina C w większości przypadków nie zapobiegła negatywnym skutkom oddziaływania obu metali. Największe jej ilości wychwytywane są przez narządy o wysokiej aktywności metabolicznej. W związku z tym anty- bądź prooksydacyjne działanie kwasu askorbinowego będzie różne w poszczególnych tkankach (19). W dużych dawkach, w obecności metali aktywnych w reakcjach redox, może ona działać jako prooksydant, przyczyniając się do formowania rodników hydroksylowych, jednej z najbardziej aktywnych form ROS. Prowadzi to do nasilenia procesów utleniania lipidów, białek, czy DNA. Istniejące w literaturze rozbieżności dotyczące ochronnego działania witaminy C na lipidy, białka i DNA mogą wynikać z różnej zdolności makromolekuł do wiązania jonów metali i natężenia reakcji redox zachodzących z udziałem tych jonów (20).

Wyniki badań nie wykazują zmian w poziomie wskaźników biochemicznych, co może być spowodowane krótkim czasem ekspozycji na Cd i Pb. Przy krótkotrwałym narażeniu wzrasta poziom prekursorów SO, a więc i jego nasilenie. Jednak przy dłuższej ekspozycji spada ono na skutek uruchomienia mechanizmów obronnych takich jak wzrost poziomu glutationu, czy metalotioneiny, będącej jednym z elementów detoksykacji (2). Badania zwierząt narażonych na zanieczyszczenia obecne w środowisku naturalnym wykazały u nich zaburzenia profilu endokrynologicznego oraz wzrost poziomu wskaźników biochemicznych, głównie odzwierciedlających funkcję wątroby. Wzrost aktywności AST u szczurów otrzymujących oba metale wraz z witaminą E może wskazywać na inny niż oksydacyjny mechanizm powstawania uszkodzeń (tab. I). Z kolei wzrost koncentracji białka całkowitego w grupach (Pb) i (CdPb), prawdopodobnie jest skutkiem odmiennego mechanizmu indukowania SO przez oba metale i być może silniejszym prozapalnym oddziaływaniem ołowiu, który stymuluje syntezę białek ostrej fazy i białek „stresozależnych” (2, 8).

WNIOSKI

1. Największe nasilenie stresu oksydacyjnego mierzone poziomem MDA miało miejsce u zwierząt otrzymujących kadm i ołów łącznie oraz oba te metale wraz z witaminą C

2. Witamina E podawana wraz z Cd i Pb, w przeciwieństwie do witaminy C, w dużym stopniu niwelowała występowanie SO indukowanego przez oba te metale, nie zapobiegała natomiast zaburzeniom powstającym na drodze innej, niż stres oksydacyjny (wzrost aktywności AST w osoczu).

M. Jedlińska-Krakowska

INFLUENCE OF CADMIUM, LEAD AND VITAMIN E AND C ON THE LEVELS
OF SELECTED OXIDATIVE AND BIOCHEMICAL INDICES IN RAT MALES

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of cadmium and lead given during 25 days of the experiment in drinking water separately or in combination, or both metals given simultaneously in combination with intramuscular injections of vitamin E and C, on the levels of oxidative (malondialdehyde – MDA, glutathione peroxidase – GPx) and biochemical (uretic acid, total protein, creatinine, glucose, cholesterol, AST, ALT) indices in lungs, kidneys, liver, heart, testes and blood of experimental animals. Adult male Wistar/Hannover strain rats were used in the experiment. Cadmium and lead administered simultaneously and both metals given in combination with vitamin C resulted in increased GPx in blood, while their administration with vitamin E caused a rise in the activity of AST. Lead and cadmium given together in combination with vitamin C caused a rise of MDA concentration in kidneys and liver, whereas both metals given simultaneously but without vitamins caused higher MDA concentrations in lungs. Cd and Pb and both metals administered with vitamin C brought an increase of MDA in testes, what was not observed in rats receiving cadmium and lead simultaneously with vitamin E. Lead given separately caused increase of MDA level in heart, whereas Cd, Cd and Pb together and vitamin C administered separately caused an increase of this index in blood. In rats injected with vitamin E, the level of MDA was significantly lower in heart and blood compared with the same indices in the control group of rats. Thus, vitamin E, in contrast to vitamin C, seems to have stronger antioxidative activity under conditions of oxidative stress caused by cadmium and lead.

PIŚMIENNICTWO

1. *Ercal N., Gurer H., Aykin Burns N.*: Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2001; 1: 529-539. – 2. *Fowler B.A., Whittaker M.H., Lipsky M., Wang G., Chen X.Q.*: Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: An overview. *BioMetals*, 2004; 17: 567-568. – 3. *Stochs S.J., Bagchi D.*: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med.*, 1995; 18: 321-336. – 4. *Pourahmad J., O'Brien P.J.*: A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu^{2+} and Cd^{2+} . *Toxicology*, 2000; 143: 263-273. – 5. *Paglia D.E., Valentine W.N.*: Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Med.*, 1967; 70: 158-169. – 6. *Ward A.P., Till O.G., Hatherill J.R., Annersley T.M., Kunkel R.G.*: Systematic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation. *J. Clin. Invest.*, 1985; 76: 517-527. – 7. *Kolacz R., Dobrzański Z., Bodak E.*: Bioakumulacja Cd, Pb i Hg w tkankach zwierząt. *Medycyna Wet.*, 1996; 52: 686-691. – 8. *Skoczyńska A., Poręba R., Sieradzki A., Andrzejak R., Sieradzka U.*: Wpływ ołowiu i kadmu na funkcje układu immunologicznego. *Med. Pr.*, 2002; 53: 259-264. – 9. *Dagget D.A., Oberley T.D., Nelson S.A., Wright L.S., Kornguth S.E., Siegel F.L.*: Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression on

oxidative stress. *Toxicology*, 1998; 128: 191-206. – 10. *Sabolić I.*: Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals, *Nephron Physiol.*, 2006; 104: 107-114.

11. *Pillai A., Gupta S.*: Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: Effects of vitamin E and Mn^{2+} . *Free Radic. Res.*, 2005; 39: 707-712. – 12. *Turner T.T., Lysiak J.L.*: Oxidative stress: A common factor in testicular dysfunction. *J. Androl.*, 2008; 29: 488-498. – 13. *Bizarro P., Acevedo S., Nino-Cabrera G., Mussali-Galante P., Passos F., Avila-Costa M.R., Fortoul T.*: Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead cadmium mixture. *Reprod. Toxicol.*, 2003; 17: 561-566. – 14. *Kasperczyk A., Kasperczyk S., Horak S., Ostalowska A., Grucka-Mamczar E., Romuk E., Olejek A., Birkner E.*: Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008; 228: 378-384. – 15. *Barbosa Jr F., Sertorio J.T.C., Gerlach R.F., Tanus-Santos J.E.*: Clinical evidence for lead-induced inhibition of nitric oxide formation. *Arch. Toxicol.*, 2006; 80: 811-816. – 16. *Łuszczewski A., Matyska-Piekarska E., Trefler J., Wawer I., Łacki J., Śliwińska-Stańczyk P.*: Reaktywne formy tlenu - znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia*, 2007; 45: 284-289. – 17. *Liebler D.C., Matsumoto S., Iitaka Y., Matsuo M.*: Reactions of vitamin E and its model compound 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol with ozone. *Chem. Res. Toxicol.*, 1993; 6: 69-74. – 18. *Wohaieb S.A., Tohala S.H., Al-Dewachi O.S.*: Effect of vitamin E on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in rabbits. *Iraqi J. Wet. Sci.*, 1994; 7: 2, 81-84. – 19. *Banhegyi G., Braun L., Csala M., Puskas F., Mandl J.*: Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radical Biol. Med.*, 1997; 23: 793-803. – 20. *Carr A., Frei B.*: Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.*, 1999; 13: 1007-1024.

Adres: 10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 13.