

Zakład Chemii Toksykologicznej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej. Wydział Farmaceutyczny. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik Zakładu: doc. dr Halina Bronisz

Bogdan MIZAK

Wpływ zatrucia związkami fosforoorganicznymi na aktywność acylohydrolaz acylocholinowych u zwierząt stałocieplnych

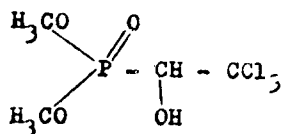
Влияние отравления фосфоорганическими соединениями на активность
ацилохолиновых ацилогидролаз у теплокровных животных

Effects of Organophosphate Pesticides Poisons on the Acylohydrolase
Activity in Homothermal Animals

Równocześnie ze wzrostem chemizacji rolnictwa, całe społeczeństwo jest narażone na codzienne przyjmowanie małych ilości pestycydów z żywnością lub w wyniku zanieczyszczeń środowiska życia człowieka. Są to narażenia na przewlekłe zatrucia, przebiegające w formie utajonej, poza świadomością człowieka. Dlatego na całym świecie prowadzone są badania nad ustaleniem wpływu małych dawek pestycydów, nie wywołujących widocznych objawów zatrucia, ale mogących wywołać wpływ szkodliwy na procesy biochemiczne i czynności fizjologiczne.

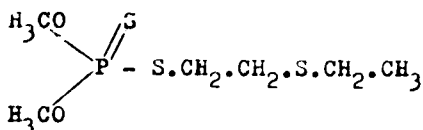
W związku ze stosowaniem w naszym rolnictwie, sadownictwie i warzywnictwie polskiego Foschloru (Trichlorfonu) oraz czeskiego Intrationu (Thiometonu)

Foschlor



O,O-dwumetylo-/1-hydroksy-
2,2,2-trójchloroetylo/-
-fosfonian

Intration



O,O-dwumetylo-S-/etylomerkapto-
etylo/-dwutiofosforan

powstaje pytanie, czy ilość preparatów, jakie pozostają w artykułach spożywczych i są uważane w naszym kraju jako „najwyższe dopuszczalne pozostałości pestycydów”, jak również ich ilości wielokrotnie większe oraz mniejsze, w czasie długotrwałego spożywania nie powodują zatruc.

Celem naszej pracy było zbadanie po zatruciu krótkookresowym szczurów Foschlorem i Intrationem oraz mieszaniną tych związków, wpływu na zmiany aktywności hydrolazy acetylocholinowej (3.1.1.7, AcChE, acetylocholinoesterazy) w krwinkach czerwonych i tkance mózgowej oraz aktywności acylohydrolazy acylocholinowej (3.1.1.8, ChE, cholinoesterazy) w osoczu krwi, wątrobie i mięśniu sercowym.

MATERIAŁ I METODY

Przeprowadzone badania składały się z trzech doświadczeń. W pierwszym doświadczeniu szczurom podawano Intration, w drugim — Foschlor, a w trzecim — mieszaninę Intrationu i Foschloru. Wszystkie doświadczenia wykonane zostały na 260 białych szczurach samicach rasy Wistar, o średnim ciężarze ciała $181 \pm 2,3$ g. Przed doświadczeniem zwierzęta trzymano w stałych warunkach hodowlanych. W czasie badań wszystkie zwierzęta karmiono standardową granulowaną mieszanką paszową, w ilości 20 g na jednego szczura na dobę. Wodę do picia podawano *ad libitum*.

Do badań użyto Foschlor R-50, III klasa toksyczności, produkowany w Zakładach Chemicznych „Azot” w Jaworznie. Foschlor R-50 zawiera 50% składnika czynnego. Intration, należący do II klasy toksyczności, był produkcji Zakładów Chemicznych im. J. Dimitrowa w Bratysławie — CSSR. Intration zawiera też 50% składnika czynnego. Badane preparaty podawano szczurom codziennie sondą *per os* w roztworze wodnym w takiej ilości, jaka znajdowałyby się w 20 g paszy przy najwyższej dopuszczalnej pozostałości pestycydów w żywności, ustalonej dla każdego z tych związków i obowiązującej w krajach RWPG w roku 1967. Dla Foschloru największa dopuszczalna pozostałość wynosiła 1 mg/kg, a dla Intrationu 0,5 mg substancji czynnej na 1 kg artykułu spożywczego. Obecnie dla Foschloru największa dopuszczalna pozostałość wynosi 0,5 mg/kg, a proponowana jest dla Intrationu 0,5 mg/kg żywności (rok 1973). Badane związki podawano szczurom również w ilościach kilkakrotnie większych i mniejszych od dopuszczalnych (Foschlor 5 i 10 mg/kg; Intration 0.1 i 0,5 mg/kg). Mieszaninę tych związków podawano w ilościach: Intration 0.05 mg/kg + Foschlor 1 mg/kg oraz Intration 0.1 mg/kg + Foschlor 1 mg/kg paszy.

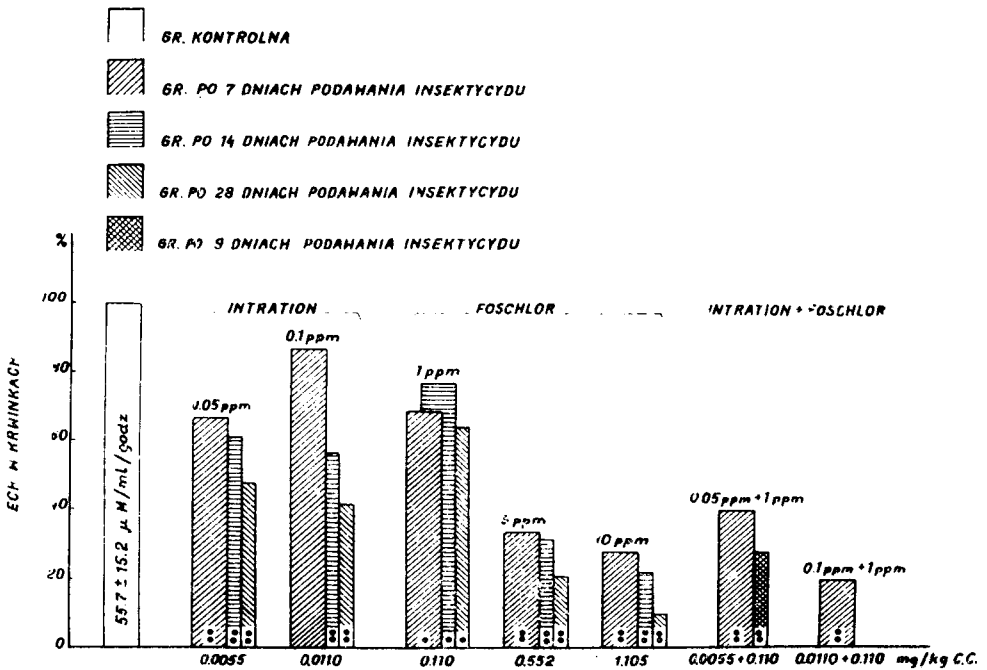
Wszystkie szczury zostały podzielone losowo na podgrupy, po 10 sztuk w każdej. Pierwszej grupie szczurów, składającej się z trzech podgrup, podawano codziennie sondą *per os* Foschlor R-50 w ilości 0.11 mg/kg ciężaru ciała (1 mg/kg paszy), w przeciwieństwie do aktywnej substancji. Po 7 dniach (po 24 godzinach od ostatniego podania trucizny) szczury z pierwszej podgrupy ważono, a następnie zabijano przez dekapitację, z drugiej podgrupy po 14 dniach, a z trzeciej podgrupy po 28 dniach podawania Foschloru. Po przecięciu tętnicy szyjnej, krew od szczurów pobierano do probówki z heparyną, łagodnie wysuszoną strumieniem ciepłego powietrza. Następnie robiono sekcję i niezwłocznie pobierano wycinki wątroby (przedni płat), mięśnia sercowego (koniuszek), tkanki mózgowej (istota szara półkul mózgowych). Pobrane materiały biologiczne służyły do wykonania oznaczeń aktywności hydrolazy acetylocholinowej (AcChE) w krwinkach czerwonych i tkance mózgowej, acylohydrolazy acylocholinowej (ChE) w osoczu krwi, wątrobie i mięśniu sercowym. W wypadku konieczności, materiał do oznaczeń przetrzymywano w lodówce w temp. -7°C .

Identycznie postępowano z następnymi grupami szczurów składających się z podgrup, które otrzymywały Foschlor w ilości 0,552 mg substancji czynnej na 1 kg ciężaru ciała (5 mg/kg paszy) i 1,105 mg/kg ciężaru ciała (10 mg/kg paszy) oraz Intration w ilości 0,0055 mg substancji czynnej na 1 kg c. ciała (0,05 mg/kg paszy) i 0,0110 mg/kg ciężaru ciała (0,1 mg/kg paszy). Szczury, którym podawano mieszaninę tych związków w ilości 0,011 mg/kg ciężaru ciała Intrationu + 0,11 mg/kg ciężaru ciała Foschloru, dekapitowano po 7 dniach podawania, a szczury, którym podawano 0,0055 mg/kg ciężaru ciała Intrationu + 0,11 mg/kg ciężaru ciała Foschloru — po 7 i 9 dniach zatruwania. Związki te rozcieńczane wodą destylowaną podawano w ogólnej objętości 0,4 cm³ roztworu. Grupę kontrolną stanowiło 10 sztuk szczurów wybranych losowo z całości. Szczurom tym podawano sondą *per os* 0,4 cm³ wody destylowanej przez 28 dni. Aktywność acylohydrolaz acylocholinowych w krwinkach czerwonych, tkance mózgowej oraz w osoczu krwi, wątrobie i mięśniu sercowym oznaczano metodą podaną przez Juszkiewicza i współpr. (4).

WYNIKI WŁASNE I OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki z doświadczeń analizowano za pomocą metod statystycznych stosując dla porównania średnich test Studenta (7). Dla łatwiejszego porównywania uzyskanych wyników badań, wartości te ujęto w formie ryc. 2—6, obrazujących procentowe zmiany badanych wskaźników w stosunku do grupy kontrolnej przyjętej za 100%. W kolumny grupy kontrolnej wpisano wartości bezwzględne (średnia ± błąd standardowy) (ryc. 2—6). Z przeprowadzonych badań wynika, że podawanie młodym szczurom samicom codziennie *per os* Intrationu w ilości 0,05 mg i 0,1 mg substancji czynnej na 1 kg paszy oraz Foschloru 1 mg, 5 mg i 10 mg substancji czynnej na 1 kg paszy doprowadza po pewnym czasie do zatrucia. Z podgrupy szczurów, którym podano Foschlor w ilości 10 mg/kg paszy, po 28 dniach pozostało przy życiu tylko 30% i na tej ilości wykonano oznaczenia enzymu. Objawy zatrucia Foschlorem tej podgrupy szczurów były podobne do obrazu zatrucia innymi związkami fosforoorganicznymi u zwierząt i człowieka. Podgrupę szczurów, którym podano Intration w ilości 0,5 mg/kg, wykluczono z dalszego doświadczenia ze względu na zbyt wczesne objawy zatrucia.

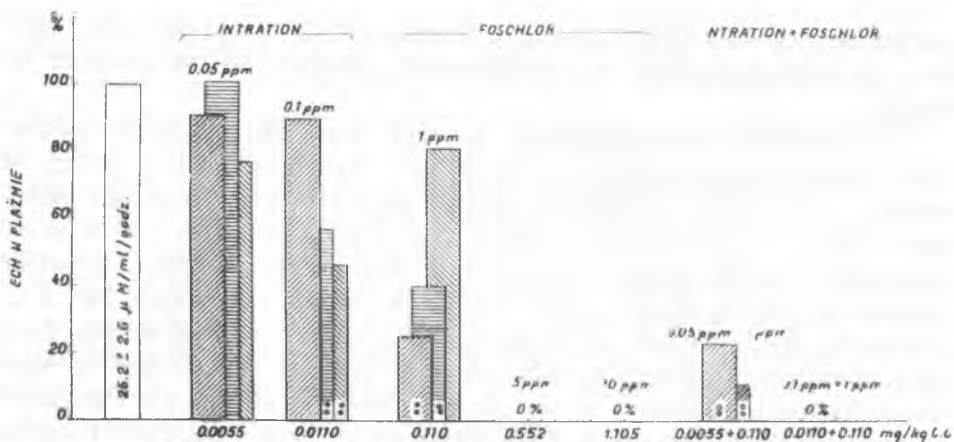
Jednoczesne podawanie Intrationu i Foschloru w ilości 0,05 mg/kg + 1 mg/kg paszy — po 9 dniach spowodowało śmierć 20% zwierząt. U pozostałych przy życiu po tym czasie, wykonano oznaczenia. Po dawce mieszaniny 0,1 mg Intrationu/kg paszy + 1 mg Foschloru/kg paszy — już po 4 dniach padł jeden szczur. U pozostałych wystąpiło zmniejszenie ruchliwości, nastroszenie włosów, pocenie się, niezborność ruchów, a u niektórych drżenie włókienkowe mięśni. We wszystkich podgrupach zwierząt stwierdzono po pewnym czasie niechęć do przyjmowania pokarmu i picia wody. To zmniejszone spożywanie pokarmu i wody pogłębiało się wraz z upływem czasu.



Ryc. 2. Zmiany aktywności hydrolazy acetylocholinowej w krwinkach czerwonych krwi szczurów samic, po podaniu Intrationu i Foschloru. Średnie wartości bezwzględne wyrażono w procentach względem grupy kontrolnej przyjętej za 100%. Liczby w słupku niezakreślonym przedstawiają aktywność enzymu szczurów kontrolnych i określają ją w wartości bezwzględnej. Kropka (.) u podstawy słupka oznacza różnicę statystycznie znamiennej w porównaniu z kontrolą przy $P < 0,05$, a dwie kropki przy $P < 0,001$

Changes in acetylcholine hydrolase activity in erythrocytes of female rats after administering Intration and Foschlor. Mean absolute values expressed as percentage of control group (100%). Numbers in the unshaded column represent enzyme activity in control rats in absolute value. A point (.) at the base of the column denotes statistically significant difference compared with control value at $P < 0,05$; two points (:) at $P < 0,001$. Control group — plain bars; group which received insecticide during 7 days — to the right upwards-hatched bars; group which received insecticide during 14 days — horizontally-hatched bars; group which received insecticide during 28 days — to the right downward-hatched bars; group which received insecticide during 9 days — squared-hatched bars

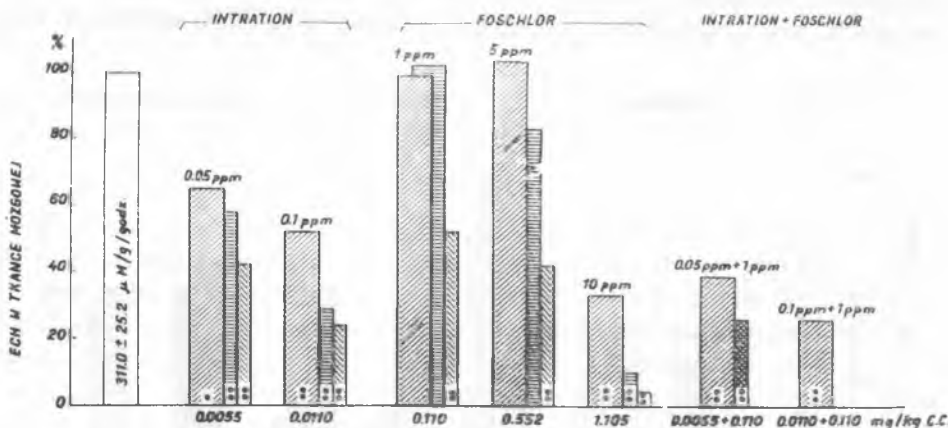
Najmniejsza podawana dawka Intrationu 0,05 mg substancji czynnej na 1 kg paszy oraz najmniejsza Foschloru 1 mg substancji czynnej na 1 kg paszy, powodowała już po 7 dniach unieczynnienie aktywności acylohydrolaz acylocholinowych w osoczu krwi, erytrocytach, tkance mózgowej, wątrobie i mięśniu sercowym. U wszystkich badanych i padłych szczurów w czasie sekcji nie stwierdzono zmian wizualnych w obrębie



Ryc. 3. Zmiany aktywności acylohydrolazy acylocholinowej w osoczu krwi szczurów samic, po podaniu Intrationu i Foschlöru. Pozostałe objaśnienia i oznaczenia jak na ryc. 2

Changes of acylocholine acylohydrolase activity in blood plasma of female rats after Intration and Foschlör administration. Further legend like in the Fig. 2

narządów wewnętrznych i tkance mózgowej, co zgodne jest z doniesieniami innych autorów (1). Szczegółowych badań anatomopatologicznych, histologicznych i morfologicznych nie przeprowadzono. Stwierdzono, że małe dawki Intrationu i Foschlöru podawane razem w mieszaninie, zwiększały wzajemnie działanie toksyczne, które nie wynikało z sumu-



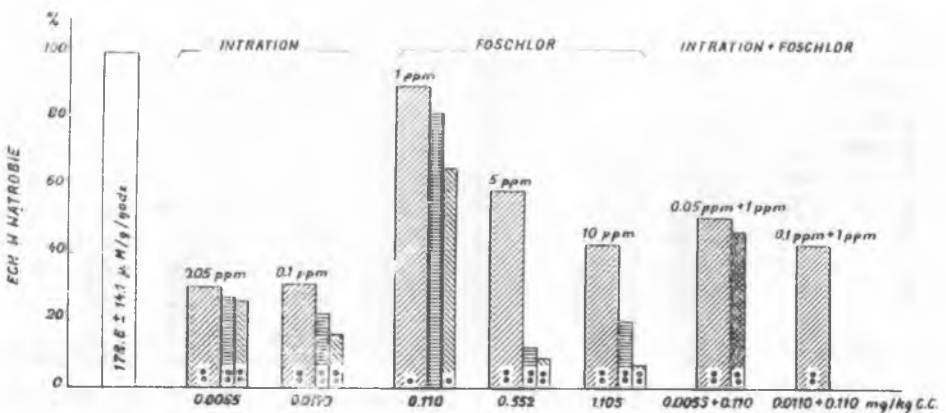
Ryc. 4. Zmiany aktywności hydrolazy acetylcholinowej w tkance mózgowej szczurów po podaniu Intrationu i Foschlöru. Pozostałe objaśnienie i oznaczenia jak na ryc. 2

Changes of acylocholine acylohydrolase activity in livers of rats after Intration and Foschlör administration. Further legend like in the Fig. 2

jącego się działania tych substancji. Stopnia skojarzonego działania, czyli tzw. stopnia synergizmu, ani współczynnika skojarzonej toksyczności nie badano.

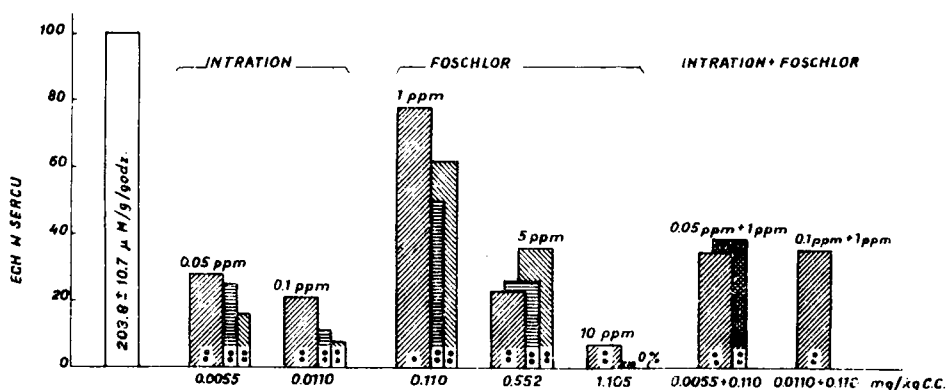
Na podstawie przedstawionych na wykresach danych zmian aktywności acylohydrolaz acylocholinowych w badanym materiale widać, że związki te hamowały aktywność enzymu we wszystkich badanych narządach (ryc. 2—6). Inhibicyjny wpływ tych związków na enzym wzrastał wraz ze wzrostem dawki trucizny i w miarę upływu czasu. Zjawisko zwiększonej toksyczności, obserwowane w czasie podawania szczerom mieszaniny tych związków, występuje przypuszczalnie na skutek działania hamującego jednego ze składników na enzymy powodujące detoksycację drugiego związku i w ten sposób potęguje aktywność toksykologiczną. Już ilości Intrationu 0,05 mg/kg paszy oraz Foschloru 1 mg/kg paszy, powodowały hamowanie aktywności enzymu. Wydaje się, że w przypadku podawania codziennie małych dawek tych substancji, acylohydrolazy acylocholinowe nie nadążają w pełni z wyrównywaniem swojej aktywności do chwili podania następnej nowej dawki trucizny. Od tego uzależnione jest postępowe spadanie ich aktywności. Hamowanie aktywności acylohydrolaz acylocholinowych w różnych narządach pod wpływem związków fosforoorganicznych, jak również ich powolny powrót do poziomu wyjściowego opisuje szereg autorów (2, 3, 5, 6).

W moich badaniach stwierdzono różny stopień hamowania aktywności acylohydrolaz acylocholinowych w różnych narządach, przy czym uzależnione to było od czasu podawania, wielkości dawki i rodzaju związku fosforoorganicznego. Foschlor najbardziej hamował aktywność enzymu w osoczu krwi, następnie w podobnym stopniu w mięśniu sercowym i wą-



Ryc. 5. Zmiany aktywności acylohydrolazy acylocholinowej w wątrobie szczurów, po podaniu Intrationu i Foschloru. Pozostałe objaśnienia i oznaczenia jak na ryc. 2
Changes of acetylcholinesterase activity in livers of rats after Intration and Foschlor administration. Further legend like in the Fig. 2

trobie oraz w krwinkach czerwonych i w najmniejszym stopniu w tkance mózgowej. Natomiast Intration najbardziej hamował aktywność enzymu w mięśniu sercowym i wątrobie, następnie w tkance mózgowej, erytrocytach i w najmniejszym stopniu w osoczu krwi. Jednoczesne podawanie Intrationu i Foschloru w mieszaninie powodowało największe zahamowanie aktywności enzymu w osoczu krwi, następnie w erytrocytach i tkance mózgowej oraz w podobnym stopniu w mięśniu sercowym i wątrobie (ryc. 2—6). Mieszanina tych związków powodowała wzrost działania toksycznego, które nie wynikało z sumującego się działania tych substancji. Wyniki badań wskazują na to, że drobne uszkodzenia w układach biochemicznych białych szczurów, przy powtarzającym się narażeniu na małe ilości Intrationu oraz Foschloru nie są w stanie regenerować się i stopniowo narastają objawy patofizjologiczne.



Ryc. 5. Zmiany aktywności acylohydrolazy acylocholinowej w mięśniu sercowym szczurów, po podaniu Intrationu i Foschloru. Pozostałe objaśnienia i oznaczenia jak na ryc. 2

Changes of acetylcholinesterase activity in heart muscle of rats after Intration and Foschlor administration. Further legend like in the Fig. 2

WNIOSKI

1. Nawet dopuszczalne pozostałości w żywności Intrationu i Foschloru mogą być szkodliwe dla organizmu stałocieplnego.

2. Jednoczesne podawanie szczurom w małych dawkach Intrationu i Foschloru, powoduje zwiększenie wzajemnie działania toksycznego, które nie wynika z sumującego się działania tych dawek trucizny.

3. Małe ilości Intrationu, Foschloru oraz mieszanina obu tych związków, unieczynnijają aktywność acylohydrolaz acylocholinowych w erytrocytach, tkance mózgowej, osoczu krwi, wątrobie i mięśniu sercowym szczurów. Inhibicyjny wpływ tych związków na enzym wzrasta wraz ze wzrostem dawki trucizny oraz upływem czasu trwania ekspozycji, przy czym stopień hamowania enzymu jest różny w różnych narządach.

PIŚMIENICTWO

1. Gaines T. B.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2, 88—90, 1960.
2. Giachetti A., Ciappi C., Baccini K.: *Ricerca Scint.* 36, 1081—1082, 1966.
3. Hais K., Melichar B.: *Veterinarni Medicina* 8, 31—40, 1963.
4. Juszkiewicz T., Mizak B., Paleolog A.: *Med. Wet.* 22, 303—306, 1966.
5. Rusiecki Wł., Kubikowski P.: *Toksykologia Współczesna*, PZWL, Warszawa 1964.
6. Shimamoto Kiro, Hattori Keisuke: *Acta Schole Med. Univ. Kioto* 39, 128—137, 1966.
7. Snedecor G.: *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames Iowa, USA, 1961.

Otrzymano 12 I 1974.

РЕЗЮМЕ

Предметом исследований было изучение вредности Intration'a и Foschlor'a, соединений из группы фосфоорганических инсектицидов, подаваемых в небольших дозах в течение длительного времени. В качестве показателей биохимических изменений было принято сохранение активности цилохолиновых ацилогидролаз в плазме крови, эритроцитах, мозговой ткани, печени и мышце сердца у крыс. Результаты исследований указывают на то, что маленькие количества этих соединений, подаваемые в течение длительного времени, могут оказывать вредное действие на теплокровный организм. Совместное введение в малых дозах Intration'a и Foschlor'a оказывает синергитическое действие. Обнаружено различие в степени торможения энзима в зависимости от величины дозы, продолжительности экспозиции и от рода ткани.

SUMMARY

The harmful influence of organophosphate pesticides poisons — Intration and Foschlor — administered in small doses for a rather long time was investigated. Indicators of biochemical troubles were: acylocholine acylohydrolase activity in blood plasma, erythrocytes, brain tissue, liver and in heart muscle in rats.

Small doses of these compounds within the range of allowed food remnants administered for a rather long time have a harmful influence on a homothermal organism. Intratron and Foschlor in small doses act synergically. The enzym repressing action differed according to the dose size, to exposition time and to the type of tissue.