

3. Przed przystąpieniem do terapii *otitis externa* konieczna jest bakteriologiczna identyfikacja czynnika etiologicznego schorzenia oraz ustalanie jego wrażliwości na leki.

#### Pismienictwo

1. Aspoj E.: Nord. Vet. Med. 29, 440, 1977.
2. Bekemeier H., Braun W., Friedrich E., Kela H., Metzner J., Schneidewind E., Schweiberger R., Wozniak K. D.: Derm. Mschr. 159, 443, 1973.
3. Borowski J.: Post. Mikrobiol. 15, 65, 1976.
4. Cizmarik J., Trupl J.: Pharmazie 30, 406, 1975.
5. Cizmarik J., Trupl J.: Pharmazie 31, 55, 1976.
6. Cizmarik J., Trupl J.: Pharmazie 31, 656, 1976.
7. Furowiec A., Hewicz L., Stojko A., Szaflarska-Stojko E., Zaleski W.: Przeg. Stomatol. PTS Katowice 133, 137, 1964.
8. Furowiec A., Hewicz L., Zahaczewska M., Zaleski W.: Zycie wet. 39, 332, 1964.
9. Furowiec A., Hewicz L., Stojko A., Szaflarska-Stojko E.: Zycie wet. 40, 172, 1965.
10. Furowiec A., Madejski.: Bakterienarten und ihre Resistenz gegen Antibiotika bei Otitis des Hundes. 6 Fachtag-Wissenschaftliche Gesellschaft für Veterinärmed. Leipzig, 1968.
11. Furowiec A.: Kleintier-Prax. 14, 64, 1969.
12. Furowiec A.: Algunas informaciones sobre las bacterias de los animales domésticos, Bol. Proyecto Intensificación de la Producción Pecuaria, Balcarce-Anguil, Prog. Rep. Argentina-Naciones Unidas (FAO-UNSF), Argentina 1975.
13. Furowiec A.: Kompleksowa zakaźna lekooporność, rozzd. w monografii — Biostymulatory wzrostu u zwierząt, (w druku).
14. Hewicz L., Stojko A., Szaflarska-Stojko E., Zaleski W.: Przeg. Stomatol. PTS Katowice 117, 122, 1965.
15. Hewicz L., Stojko A., Zaleski W.: Zycie wet. 48, 362, 1973.
16. Jeliaszewicz J., Cybulska J., Hewiger J., Zak G.: Ziarnekowe Gram-dodatnie, biologia, rozpoznawanie i różnicowanie. Wyd. Met. PZH, Warszawa 1969.
17. Jeliaszewicz J.: Trends of antibiotics resistance of Staphylococcus aureus in Poland. Contribution to Microbiology and Immunology, Warszawa 1973.
18. Jeliaszewicz J.: Cefalosporyny — obecny stan wiedzy. PZWL, 1978.
19. Nowakowski W.: Właściwości biochemiczne szczepów Staphylococcus epidermidis izolowanych z przypadków mastitis u krów na terenie woj. katowickiego. Praca dokt. SGGW—AR, Warszawa 1974.
20. Popescu A., Braileanu C., Ghiorghiu A.: Dermato-Venerologia 12, 57, 1967.
21. Scheller S., Rogala D., Stasiak E.: Pol. Arch. wet. 11, 391, 1968.
22. Scheller S., Stojko A., Szwarznowiecka I., Obuszko Z.: Nowości wet. 8, 73, 1978.
23. Sharmann W.: Pseudomonas aeruginosa in veterinary medicine, Pseudomonas Species — Third Internat. Symp. Poznań, s. 172, 1977.
24. Starzyk J., Scheller S., Szaflarski J., Moskwa M., Stojko A.: Arzneimittel-Forschung/Drug. Res. 27, 1198, 1977.
25. Stojko A.: Doświadczalne i kliniczne badania nad stosowaniem ekstraktu propolisu, Rozp. habil. Inst. Wet. Puławy 1978.
26. Villanueva V. R., Bogdanovsky M., Barbier M., Connet M., Lavie P.: Anns. Inst. Pasteur, Paryż, 106, 292, 1964.
27. Villanueva V. R., Barbier M., Connet M., Lavie P.: Anns. Inst. Pasteur, Paryż 118, 84, 1970.
28. Staphylococci and Staphylococcal Diseases, Proc. III Int. Symp. on Staphylococci and Staphylococcal Infections, Warszawa 1975; G. Fischer Verlag, Stuttgart — New York 1976.

Adres autora: dr Artur Stojko, ul. Brynowska 25a, 40-585 Katowice.

HENRYK KRACZKOWSKI, STANISŁAW PATYRA, MARIAN WALKOWSKI

## Wpływ inhibicji esterazy cholinowej Foschlora na poziom białek i niektórych enzymów we krwi królików

Z Instytutu Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Związki fosforoorganiczne są szeroko stosowane do zwalczania pasożytów roślin i zwierząt. Ich stosunkowo wysoka toksyczność może powodować również zatrucia zwierząt użytkowych, a nawet ludzi (25, 26, 27). Charakter zaburzeń metabolicznych i objawów klinicznych powodowany jest nagromadzeniem się endogennej acetylocholino, wskutek inhibicji esterazy cholinowej przez związki fosforoorganiczne (23). Ocena jej aktywności jest pomocna w diagnostyce zatruc. Spadek aktywności tego enzymu występuje również przy schorzeniach wątroby i innych narządów, kiedy dochodzi do blokowania cholinesteraz. Blokowanie jest wynikiem unieczynnienia seryny w centrum aktywnym enzymu (2, 21, 22). Właściwości tej przypisywany jest wpływ na homeostazę i stanowi ona główny mechanizm zatrucia (1, 21, 22). Należy jednocześnie nadmienić, że związki fosforoorganiczne inaktywują nie tylko esterazy, lecz działają również na inne enzymy na przykład enzymy proteolityczne (26, 27), enzymy układu Redox (2, 22), transaminazy (25, 26). Jak wynika z przeprowadzonych badań związki te są przyczyną reakcji karbamylicacji i fosforylacji, względnie jednej z nich, aminokwasów, szczególnie tych, które występują jako wolne w tkankach i płynach ustrojowych, czego wynikiem mogą być zmiany zachodzące w zawartości we krwi azotu alfa-aminowego, który odzwierciedla zachowanie

się wolnych aminokwasów we krwi (9, 22).

Foschlor, znany również pod nazwą Trichlorfon, jest metylowanym i chlorowanym fosfonianem i stosuje się go do zwalczania pasożytów roślin i zwierząt. Zatrucie tym preparatem manifestuje się u zwierząt występowaniem zaburzeń w układzie naczyniowym i oddechowym oraz różnego stopnia objawami o charakterze muskarynowo-nikotynowym (10, 11, 18).

#### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 25 królikach-mieszaniach o ciężarze ciała ok. 4—5 kg. Podzielono je na dwie grupy, z których pierwsza liczyła 12 sztuk, a druga 13 sztuk. Królikom obydwu grup podawano jednorazowo domięśniowo Foschlor w letalnej dawce 500 mg na kg ciężaru ciała. Foschlor rozpuszczano w glikolu propylenowym i etanolu w stosunku 1:1:1.

Króliki grupy pierwszej nie były leczone, grupy drugiej leczone atropiną w ilości 5 mg/kg. Preparaty te podawano jednorazowo, domięśniowo, po pojawieniu się pierwszych objawów zatrucia w postaci ślinienia, podniecenia i włóknikowego drżenia mięśni. Krew do oznaczeń pobierano z żyły brzożnej ucha do heparynizowanych probówek.

U zwierząt oznaczano w osoczu krwi: białko całkowite — refraktometrycznie, frakcje białkowe — kolorymetrycznie, po rozdziale elektroforetycznym na bibule Whatman nr 1 w buforze veronalowo-medinalowym o pH=8,6 i sile jonowej  $\mu=0,1$ , azot alfa-aminowy metodą Spier-Pashera, kolorymetrycznie przy długości fali 460 nm, aminotransferazę asparaginianową i alaninową — kolorymetrycznie przy długości fali 530 nm metodą Reitmana-Frankela, a wyniki po-

dano w jednostkach międzynarodowych (IU), cholinesterazę w pełnej krwi — kolorymetrycznie, metodą Herstrina a wyniki podawano w jednostkach aktywności

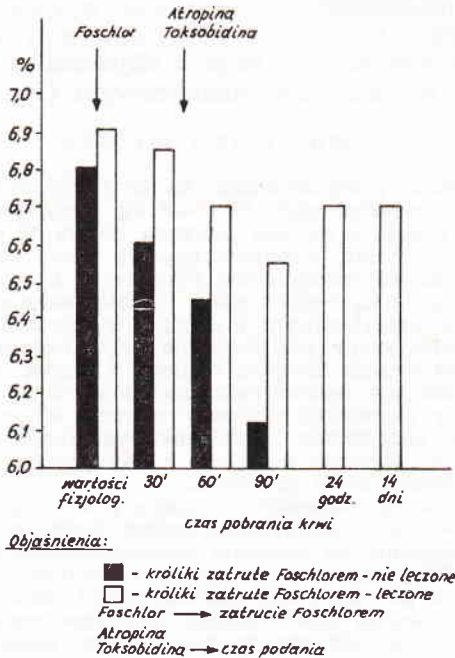
Jednostka aktywności — liczba mikromoli acetylocholinoliny (cięż. mol. 181,67) zhydrolizowanej przez 1 ml krwi w ciągu 1 godziny w temperaturze 37°C.

Pierwsze oznaczenia wskaźników biochemicznych przeprowadzono po upływie ok. 30 minut od zatrucia. Przed podaniem toksycznego preparatu oznaczano wartości fizjologiczne. Następnie królikom grupy drugiej podawano atropinę i toksobidinę. Dalsze oznaczenia w obu grupach przeprowadzono po 60 i 90 minutach od zatrucia, a w grupie drugiej (zwierzęta leczone) po 24 godzinach i 14 dniach. W przebiegu doświadczenia prowadzono obserwację nad zachowaniem się zwierząt leczonych i nie leczonych.

### Wyniki i omówienie

U królików pierwsze objawy zatrucia pojawiły się po 15—20 minutach od podania preparatu i charakteryzowały się podnieceniem i włóknikowym drżeniem mięśni. Równocześnie pojawiał się ślinotok, utrudniony oddech oraz skurcze tonicznie-kloniczne. Najmocniej zaznaczyły się te objawy w okresie około 35 minut po podaniu preparatu i prowadziły do porażek, kończących się zejściem śmiertelnym, najczęściej między 30 a 90 minutą od podania Foschloru. W grupie drugiej, po podaniu leków objawy chorobowe zatrucia cofały się w czasie kilkunastu minut.

U królików nie leczonych, w okresie 30 minut od iniekcji Foschloru, nastąpił istotny spadek ilości białka całkowitego i beta-globulin (ryc. 1 tab. 1). W tym czasie zwiększyła się ilość alfa-globulin a poziom albumin i azotu alfa-aminowego nie uległ zmianie (ryc. 2, tab. 1). Równoległe z tymi zmianami zwiększyła się znamienne aktywność aminotran-



Ryc. 1. Białko całkowite

sferazy asparaginianowej a zmniejszyła — alaminowej (ryc. 3). W tej grupie 75% królików padło po 90 minutach od zatrucia, a pozostałe w ciągu kilkunastu godzin, przy utrzymujących się objawach chorobowych.

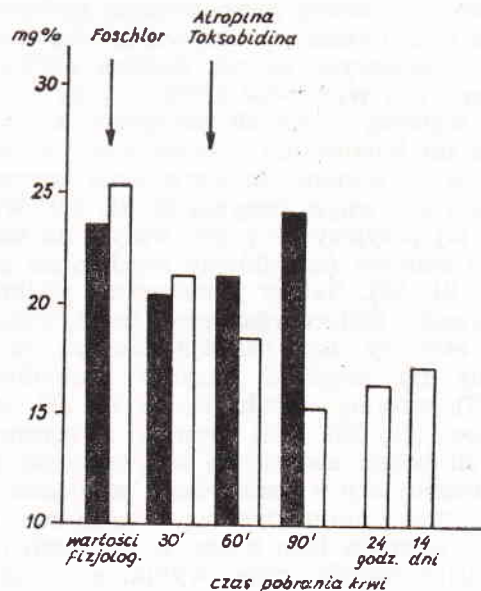
U królików leczonych poziom białka całkowitego, po początkowym spadku, kształtował się na wyższym poziomie aniżeli u zwierząt nie leczonych, a po upływie 24 godzin osiągnął wartość wyjściową.

Tab. 1. Frakcje białkowe

Wartości fizjologiczne	Albuminy		Globuliny					
	A	B	Alfa		Beta		Gamma	
	A	B	A	B	A	B	A	B
30,15	39,16	17,30	20,00	16,40	17,00	28,15	23,84	
30 minut	39,00	34,00	19,40	22,00	15,70	15,80	25,90	28,20
60 minut	38,20	36,40	22,15	22,15	14,20	16,20	25,45	26,25
90 minut	37,20	40,00	23,00	19,50	14,10	15,70	25,70	24,80
24 godziny	—	32,74	—	19,40	—	17,13	—	30,71
14 dni	—	31,15	—	19,00	—	17,00	—	32,85

Objaśnienia: A — króliki nie leczone, B — króliki leczone atropiną i toksobidyną.

Natomiast poziom beta- i gamma-globulin był wyższy, a alfa-globulin i albumin niższy niż w grupie pierwszej, nie leczonej (tab. 1). W tej grupie zwierząt zwiększyła się aktywność obydwu aminotransferaz (ryc. 3). Po upływie 14 dni doświadczenia oznaczone parametry wróciły do poziomu wyjściowego. Jedynie azot alfa-aminowy był nadal obniżony o około 50%. W grupie drugiej padło około 30% królików, w pierwszych dniach po zatruciu. U zwierząt, które zginęły, oznaczane parametry kształtowały się podobnie jak u królików nie leczonych. W grupie leczonej 70% zwierząt przeżyło, a zaburzenia kliniczne szybko ustąpiły i stwierdzono powrót do normy. Kształtowanie się aktywności cholinesterazy (ChE) w grupie królików nie leczonych i leczonych przedstawia ryc. 4.



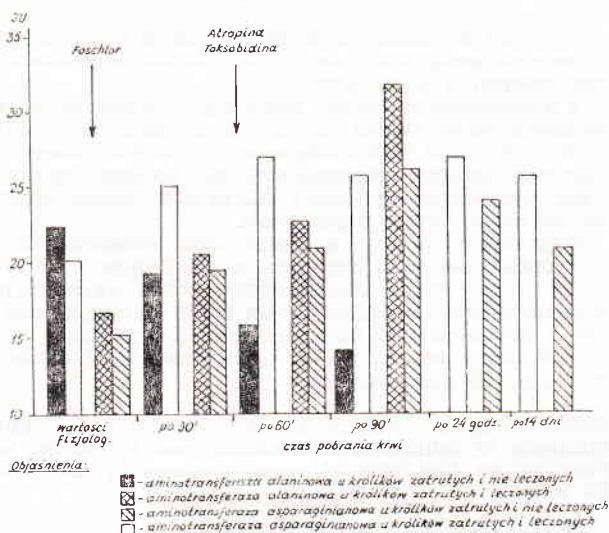
Ryc. 2. Azot alfa-aminowy



Wyniki badań grupy królików zatrutych a nie leczonych wykazały, że letalna dawka Foschloru, w ciągu 30 minut od zatrucia obniża aktywność ChE o około 32%. W następnych 30 minutach inaktywacja pogłębia się nadal o około 22%. Z chwilą unieczynnienia ChE o około 50% dalsza jej inhibicja zachodzi w niewielkim stopniu. W wyniku spadku aktywności ChE zwiększyła się ilość endogennej acetylocholino, która poprzez receptory cholinergiczne M i N zmieniała czynność motoryczną mięśni gładkich, poprzecznie prążkowanych i sekrecję wielu gruczołów, dając charakterystyczne objawy muskarynowo-nikotynowe. Taki efekt działania związków fosforoorganicznych wykazało wielu autorów (17, 18, 23).

dzono zmian w poziomie albumin i azotu alfa-aminowego. Mogłoby to świadczyć, że krótkotrwałe działanie letalnej dawki Foschloru bardziej zmienia mechanizm enzymatyczny przemian białkowych aniżeli powoduje uszkodzenie komórek wątroby.

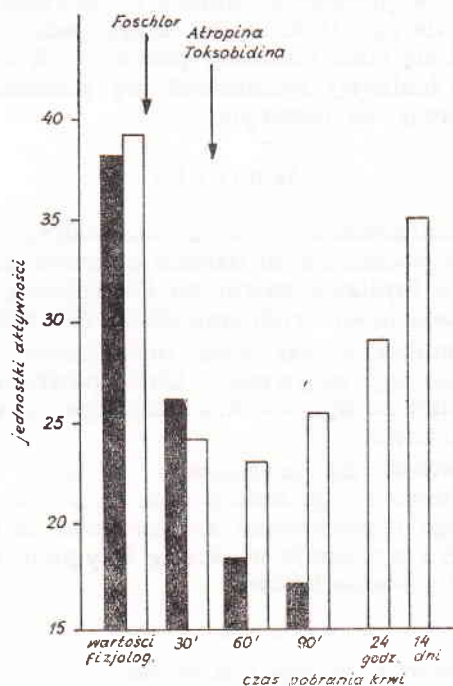
W grupie zwierząt nie leczonych letalna dawka Foschloru powodowała szybkie zejście śmiertelne z typowymi objawami zatruc związkami fosforoorganicznymi. Charakter zmian w ocenianych wskaźnikach biochemicznych i objawach klinicznych wskazuje, że istotną przyczyną śmierci zwierząt były przede wszystkim zaburzenia w przewodnictwie nerwowym, w synapsach układu wegetatywnego i somatycznego a nie stosunkowo niewielkich zmianach w metabolizmie białek. Potwierdzają to obserwacje nad przebiegiem ostrych zatruc związkami fosforoorganicznymi, podawane przez wielu autorów (6, 17, 23).



Ryc. 3. Aminotransferazy: asparaginianowa i alaninowa

Insektycydy fosforoorganiczne inaktywują nie tylko hydrolazy cholinowe, ale zmieniają również działanie enzymów proteolitycznych, transaminaz czy układu Redox (1, 2, 6, 7, 22, 25, 27). Takie bezpośrednie działanie Foschloru na enzymy lub pośrednie przez zmianę procesów metabolicznych zwiększoną ilością endogennej acetylocholino powodowało spadek białka całkowitego, beta- i gamma-globulin a zwiększenie alfa-globulin. Podobny charakter zmian w gospodarce białkowej po zatruciach związkami fosforoorganicznymi wykazali Vartic i wsp. (25, 26, 27), Kalinowska (8), Kagan i wsp. (9) czy Beliojew (2).

Spadek ilości białka całkowitego, beta- i gamma-globulin po zatruciu Foschlorem był niewątpliwie uwarunkowany zmianą procesów enzymatycznych anabolizmu białek w wątrobie jako głównym narzędem ich syntezy. Świadczy o tym również wzrost aktywności aminotransferazy asparaginianowej a spadek alaninowej. Wuhrmann i Wunderly podają, że uszkodzenie w ostrym zapaleniu miększu wątroby powoduje spadek albumin. (24). W grupie pierwszej, królików nie leczonych, nie stwier-



Ryc. 4. Cholinesteraza (ChE)

W grupie zwierząt zatrutych i leczonych, jeszcze przed podaniem toksobidiny i atropiny, początkowe zmiany były podobne jak w grupie I. Między innymi w ciągu 30 minut od zatrucia aktywność ChE obniżyła się o około 30%, czemu towarzyszyło szybkie narastanie objawów muskarynowo-nikotynowych. Z chwilą zastosowania leczenia, po upływie kilkunastu minut cofały się w znacznym stopniu zaburzenia kliniczne, mimo, że nie zwiększała się aktywność ChE. Po 24 godzinach od podania leków zwierzęta tej grupy odzyskały pełną sprawność motoryczną i normalny apetyt, chociaż aktywność ChE była nadal obniżona o 25%. Podanie atropiny z toksobidina nie tylko powodowało cofnięcie się zaburzeń klinicznych, ale

wpłynęło również korzystnie na metabolizm białkowy. W tej grupie zwierząt, po 24 godzinach poziom białka całkowitego i beta-globulin kształtował się na poziomie wartości wyjściowych, gamma-globuliny uległy zwiększeniu i zwiększyła się również aktywność obydwu aminotransferaz. Po 14 dniach od zatrucia oznaczane parametry, z wyjątkiem azotu alfa-aminowego, kształtowały się na poziomie wartości wyjściowych. Szybki powrót królików leczonych do normalnych reakcji motorycznych, mimo obniżonej aktywności ChE we krwi, mógłby świadczyć, że acetylocholinesteraza w stykach synoptycznych bardzo szybko odzyskuje normalną aktywność. Natomiast powolny powrót do normalnego poziomu białka całkowitego i jego frakcji był uzależniony od narastania aktywności ChE. Charakter działania toksobidyny i atropiny na przywrócenie prawidłowej czynności królików przedstawił Kossakowski (10, 11). W tej grupie, mimo leczenia, zginęło w pierwszych dniach po zatruciu około 30% zwierząt. U królików, które padły, utrzymywał się stale obniżony poziom ChE a metabolizm białkowy kształtował się podobnie jak u zwierząt nie leczonych.

### Wnioski

1. Zastosowanie leczenia toksobidyną i atropiną w początkowym okresie objawów klinicznych, u królików zatrutych Foschlorom, zapobiega zejściu śmiertelnemu około 70% zwierząt.

2. Zmieniona czynność motoryczna, mimo zmniejszonej aktywności ChE, powracała do normalnej po upływie kilkunastu godzin od podania leków.

3. Powrót do normalnego poziomu białka całkowitego i jego frakcji oraz aminotransferaz przebiega równocześnie ze wzrostem aktywności ChE i występuje w okresie 2 tygodni od zatrucia i podania leków.

### Piśmiennictwo

1. Aldrige W. N.: *Biochem. J.* 46, 451, 1950.
2. Bellojew W. J.: *Weterinarija*, Moskwa 45, 58, 1959.
3. Bogusz M.: *Pol. Tyg. lek.* 23, 786, 1968.
4. Corty Mc H. T., Hanfler M., Osborn M. G., Mc Beth C. A.: *Am. J. vet. Res.* 30, 1149, 1969.
5. Cunningham L. W.: *Science* 125, 1145, 1957.
6. Davies D. R., Craen A. L.: *Adv. enzymol.* 20, 283, 1958.
7. Jansen E. F.: *J. biol. Chem.* 179, 189, 1949.
8. Kalinowska Z., Przala F., Zasadowski A., Olszewska I.: *V Symp. Toksykol. Lublin.* 1976.
9. Kogan J. S., Sasnowicz L. M., Woronina L. J.: *Gig. Sanit.* 35, 36, 1970.
10. Kossakowski S.: *Medycyna Wet.* 30, 400, 1974.
11. Kossakowski S.: *Medycyna Wet.* 30, 541, 1974.
12. Losch K., Weissflog L., Beier D.: *Arch. Exp. Vet Med.* 27, 151, 1973.
13. Motta V. R., Williams H. M., Wetstone H. J.: *Gastroenterology* 33, 50, 1957.
14. Motta V. R., Williams H. M., Wetstone H. J.: *Gastroenterology* 33, 58, 1957.
15. Meicalf R. L., Fukute T. R.: *J. Agric. Fd. Chem.* 15, 1022, 1967.
16. Norkowski S., Kossakowski S.: *Medycyna Wet.* 27, 617, 1971.
17. Patyra S., Kossakowski S., Kurek A.: *Pol. Arch. wet.* 19, 161, 1976.
18. Patyra S., Kurek A., Kossakowski S.: *Medycyna Wet.* 30, 478, 1974.
19. Porter G. R., Rydon N. H., Schofield J. A.: *Nature* 182, 927, 1958.
20. Proskuriakow M. T.: *Farmak. Toks.* 37, 238, 1974.
21. Seńczuk W., Młynarczyk W.: *Bromat. Chem. Toks.* 4, 489, 1971.

22. Szczepaniak S., Sienkiewicz E., Jeleniewicz K., Ochynski J.: *Bromat. Chem. Toks.* 4, 419, 1976.
23. Toczyńska W., Szember W., Potocka L., Turek W.: *V Symp. Toksykol. Lublin* 1976.
24. Wuhrmann F., Wunderly Ch.: *Bluteiweisskoerper des Menschen*, Schwabe, Basel, 1957.
25. Vartic N., Giurgea-Jacob R., Suten E.: *Arch. exp. VetMed.* 25, 831, 1971.
26. Vartic N., Suten E., Giurgea-Jacob R.: *Arch. exp. Vet Med.* 26, 369, 1972.
27. Vartic N., Giurgea-Jacob R., Ivascu V.: *Arch. exp. VetMed.* 26, 207, 1972.

Adres autora: doc. dr hab. Henryk Kraczkowski, ul. Krasieńskiego 6/27, 20-709 Lublin.

Крачковский Г., Патыра С., Вальковский М. — Влияние ингибиции холинэстеразы фосхлором на уровень белков и некоторых энзимов в крови кроликов.

Опыт провели на 25 кроликах в двух группах. Животным вводили однократно, внутримышечно фосхлор в дозе 500 мг/кг. Кроликов одной из групп лечили внутримышечной дозой атропина и токсобидина.

В крови кроликов определяли сырой белок и его фракции, альфа-аминовый азот, активность аминокотрансфераз и холинэстеразы.

У нелечимых животных фосхлор вызывал инактивацию холинэстеразы на ок. 50%, понижение уровня сырого белка и бета-глобулинов, а рост активности глутаматаспартаттрансаминазы при понижении глутаматаланинтрансаминазы. Животные гибли через ок. 90 минут после отравления.

В группе лечимых животных через несколько минут после введения атропина и токсобидина отсутствовали клинические расстройства, росла активность холинэстеразы, а сырой белок и его фракции вместе с моторической активностью возвращались через 24 часа к норме. В этой группе пало 30% животных, а 70% выздоровело.

Kraczkowski H., Patyra S., Walkowski M. — The influence of inhibition of cholinesterase by means of Foschlor on the level of some enzymes in the rabbit blood.

The experiments were carried out on 25 rabbits divided into two groups. The animals were given the drug once at the dose of 500 mg per 1 kg, intramuscularly. The rabbits of the experimental group were treated with atropine and toxobidine in the form of intramuscular injection. The content of total protein and protein fractions of the blood, alpha-amine nitrogen, the activity of aminotransferases and cholinesterase were determined. Foschlor brought about an inhibition of cholinesterase at about 50 per cent, a decrease of total protein, beta-globulins and alanine aminotransferase, and an increase of asparagine aminotransferase. The control animals died after 90 minutes since intoxication. The animals treated with atropine and toxobidine recovered: clinical signs disappeared, the activity of cholinesterase increased, and the level of total protein and its fractions came to the normal level after 24 hours. Seventy per cent of animals recovered and 30 per cent died in this group.

SARMA G., BARO B. R., SARMAH A. K.: Ronienie grzybicze u krowy. (Mycotic abortion in a cow). *Vet. Rec.* 105, 331, 1979 (15).

Badaniem bakteriologicznym i mikologicznym poddano treść żołądka, płuca, śledzionę poronionego cielęcia oraz łożysko. W preparatach mikroskopowych stwierdzono bezpośrednio z badanego materiału stwierdzono elementy grzyba i drożdżaki. Z łożyska, treści żołądka i płuc poronionego płodu wyosobniono *Mucor* sp. i *Candida albicans*. Wyosobniony szczep *C. albicans* był patoganny dla myszek białych.

G.