

# PATOLOGIA I TERAPIA

STEFAN KOSSAKOWSKI  
Puławy

## Mechanizm działania pestycydów fosforoorganicznych na organizm zwierzęcy. I. Unieczynnianie cholinesteraz w zatruciach pestycydami fosforoorganicznymi

Stosowanie pestycydów pozostaje w ścisłym związku z bardzo aktualnym obecnie problemem skażeń środowiska. W związku z tym poglądy odnośnie wykorzystywania pestycydów w rolnictwie były często kontrowersyjne.

Ostatnio w wyniku wszechstronnych badań przeważa pogląd, że stosowanie pestycydów w rolnictwie jest nieodzowne, natomiast zasadniczej wagi zagadnieniem jest to, aby odpowiednie pestycydy były stosowane we właściwy sposób. Tendencje te są coraz konsekwentniej realizowane za granicą i w kraju. Wyrazem jest coraz większe ograniczanie wykorzystywania odznaczających się dużą persistencją pestycydów chloroorganicznych, przy równocześnie stale wzrastającym stosowaniu znacznie mniej persistentnych lecz z kolei bardziej toksycznych pestycydów fosforoorganicznych (FO).

Syntezy organicznych połączeń fosforu rozpoczęto stosunkowo wcześniej (po raz pierwszy Clermont w 1854 r., następnie Rosenheim, a w końcu bracia Arbuzowie) (8). Właściwy jednak rozwój związków FO datuje się od lat trzydziestych bieżącego stulecia, kiedy to Schrader na zlecenie I. G. Farbenindustrie przystąpił do syntezy nowego kontaktowego insektycydu (cyt. za 45). Prace te prowadzone przy współudziale uczonych różnych specjalności dały w szybkim czasie nadspodziewanie dobre wyniki. Wyniki badań były okryte tajemnicą wojskową przez sztab niemieckiej armii, która w okresie wojny przygotowała wiele ton tych związków, bynajmniej nie do niszczenia owadów.

Po wojnie związki FO zaczęto stosować w rolnictwie i od tego czasu są one coraz bardziej rozpowszechnione na całym świecie jako środki skutecznego niszczenia pasożytów występujących na zwierzętach i roślinach.

Fakt ten w sposób istotny rzutuje na wzrost ilości zatruc zwierząt. Profilaktyka tych zatruc winna być przedmiotem zainteresowania specjalistów różnych kierunków nauk rolniczych. Realizacja odpowiednich przedsięwzięć profilaktycznych jak również skuteczne zwalczanie ewentualnych przypadków zatruc zwierząt wy-

maga jednak dokładnej znajomości mechanizmu działania związków FO na organizmy zwierząt.

Istota toksycznego działania związków FO została odkryta w ośrodku angielskim (3) w 1941 r., a opublikowana w 1947 r. (3). Wiele zasług nad poznaniem działania powyższych związków na układ enzymów wniosły prace Nachmahnsohna i Wilsona (44), Aldridge'a (4, 5), Davisona (20), Hobbigera (32, 33), Daviesa i wsp. (18), Wilsona (56), Wirtha (59), Melichara i Haisa (42) i innych.

W Polsce pierwszą obszerną pracę przedstawiającą chemizm i farmakologię związków FO opublikował Supniewski (53).

Związki FO unieczynniają cholinesterazę (ChE). Enzym ten wyodrębniony po raz pierwszy przez Stedmana i wsp. (51) rozkłada w tkankach acetylocholinę (ACh), której rola w przenoszeniu impulsów nerwowych została wyczerpująco przedstawiona w pracach Aniczkowa (6), Bircsa i Mac Intosha (15), Mac Ilzejna (40), Kibiakowa (36), Nachmahnsona (43) i innych. W związku z powyższym należy podkreślić bardzo ważny fakt, że synteza ACh odbywa się w sposób ciągły to znaczy, że prócz stacjonarnej ACh (40  $\mu\text{g}$ ) niedostępnej działaniu ChE i zmagazynowanej ACh (220  $\mu\text{g}$ ) uwalnianej pod wpływem impulsu, stale wydziela się ACh nadwyżkowa (3,5  $\mu\text{g}/24$ ).

Czas działania uwolnionej ACh reguluje występujący w organizmie enzym ChE katalizując jej hydrolizę. W ustroju żywym wyróżnia się dwa zasadnicze typy esteraz cholinowych — esterazę swoistą zwaną acetylocholinesterazą (AChE) lub hydrolazą acetylocholinową oraz nieswoistą zwaną pseudocholinesterazą (PChE) lub acylohydrolazą acylocholinową. Pierwsza z nich znajduje się głównie w krwinkach czerwonych oraz mózgu i rdzeniu kręgowym, podczas gdy PChE znajduje się głównie w osoczu krwi (54).

Jeśli idzie o cholinesterazę osocza krwi to Augustinsson (9, 10) rozróżnia trzy jej typy, a mianowicie acetylocholinesterazę (AChE), propionylcholinesterazę (PrChE) i butyrylocholinesterazę (BChE), które różnie kształtują

się u człowieka i poszczególnych gatunków zwierząt. U człowieka, małpy, psa, kota i konia występuje w osoczu krwi tylko BCE, u świni PrChE i BChE, u bydła i królika AChE i PrChE, u kozy i owcy tylko AChE podobnie jak u ryb (węgorz, szczupak), a u kaczek i kur tylko PrChE.

Stwierdzono, że u poszczególnych gatunków zwierząt aktywność ChE jest różna i waha się w dość szerokich granicach u danego gatunku, natomiast u tego samego osobnika stwierdza się wartości dość stałe (30, 47).

Rozkład ACh przez cholinesterazy przebiega w sposób następujący. Ustalono, że cząsteczka enzymu ChE posiada 30—50 „centrów aktywności”. Centrum takie wg Wilsona (56) składa się z dwóch rozmieszczonych w odległości 4—5 Å części, a mianowicie anionowej decydującej o specyficzności enzymu oraz esteratycznej (esterofilnej) warunkującej funkcję hydrolityczną enzymu. W części esteratycznej z kolei wyróżniamy grupę nukleofilną (E) zabezpieczającą tworzenie się kompleksu enzym-substrat i kwaśną (H), która jest nieodzowna do urzeczywistnienia reakcji hydrolizy.

Główną rolę w części esteratycznej odgrywa hydroksyl seryny — aminokwas włączony w polipeptydowy łańcuch enzymu, który zawsze występuje w następującym układzie:

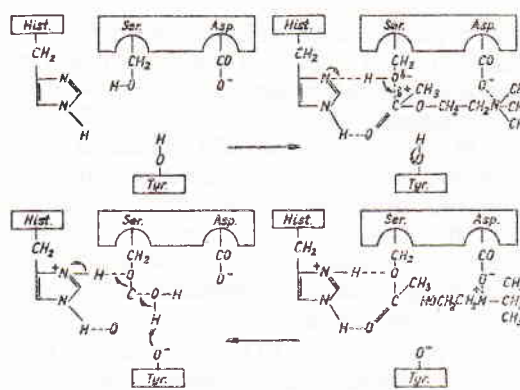
glicyna — (asparagina) — seryna — (glicyna)  
(glutamina) — (alanina)

W pobliżu seryny znajduje się ugrupowanie atomów — „dawca protonu” i drugie ugrupowanie — „akceptor protonu”. Przyjmuje się (nie udowodniono), że pierwszym jest imidazol histydyny, a drugim hydroksyl tyrozyny (49).

Kiedy drobina ACh atakuje aktywną powierzchnię ChE wówczas część anionowa, dzięki siłom elektrostatycznym przyciąga, poprzez posiadający dodatni ładunek azot, trójmetyloamoniową część ACh. Dzięki temu następuje ustawienie drobiny w koniecznej odległości od części esteratycznej. Następnie drobina enzymu dzięki spolaryzowanemu wiązaniu C=O zbliża się do grupy nukleofilnej części esteratycznej. Z kolei reszta acetylowa substratu łączy się z enzymem zmieniając zawarty w nim proton, a reszta choliny, z którym łączy się ten proton odszczepia się jako swobodna cholina.

Utworzony acetylowany ferment jest nietrwały i podlega wodnej hydrozie, która jak stwierdzono nie jest spontaniczna, a polega na odwrotnym przeniesieniu protonu i zmianie potencjału, w wyniku czego tworzy się kwas octowy i wyjściowy enzym.

Powyższy cykl przemian mediatora (ACh) i enzymu (ChE) z uwzględnieniem poprzedzających acetylację enzymu zmian konformacyjnych stwierdzanych doświadczalnie przez Jakowlewa i Agabekiana (34) oraz Kitza i Kremznera (38) przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat współdziałania cholinesterazy z acetylocholiną

Związki unieczynnijające ChE, w tym też pestycydy FO, przy współdziałaniu z nią imitują przedstawioną powyżej reakcję mediatora (ACh) z enzymem (ChE). Mechanizm współdziałania z ChE różnych inhibitorów nie jest jednak identyczny i dlatego możemy je podzielić na 3 grupy.

1. Inhibitory przyłączające się tylko do części anionowej enzymu np. urokanylocholina, propionylocholina, butyrylocholina oraz większość czwartorzędowych soli amoniowych.

2. Inhibitory przyłączające się do części esteratycznej enzymu, do których zaliczamy wszystkie pestycydy i większość środków trujących. Jak widać zawierająca fosfor część trucizny łączy się z częścią esteratyczną enzymu, powoduje jego fosforylację, blokuje go i tym samym inaktywuje.

3. Inhibitory przyłączające się do obydwu części enzymu. Do tej grupy można zaliczyć neostygmine, ezerynę i V-związki.

Aldridge (5), a następnie Jandorf (35) badając kinetykę inhibicji ChE wykazali, że proces ten przebiega w dwóch fazach. W pierwszej zachodzi reakcja odwracalna, w wyniku której tworzy się kompleks dysocjujący — jest to reakcja bimolekularna  $FO + J \rightleftharpoons FOJ$ . Druga faza to monomolekularne przejście kompleksu nietrwałego w trwały  $FO + J \rightarrow FOJ$ . Unieczynnienie więc ChE przez związki FO nie następuje natychmiast po zetknięciu się inhibitora z enzymem lecz rozwija się wolno, minuty, a nawet godziny. Tym też różnią się związki FO od ezeryny i innych nietrwałych inhibitorów, które wiążą się z ChE natychmiast.

W wyniku fosforylacji tworzy się kompleks enzym-inhibitor, który dysocjuje bardzo powoli; czas reaktywacji enzymu jest bardzo długi i praktycznie reakcja ta jest nieodwracalna (45, 48, 53). Durham i Hayes (22) podają np., że szybkość regeneracji ChE jest równoznaczna z wymianą erytrocytów w krwiobiegach i waha się w granicach 90—100 dni.

Pryncypialna więc różnica pomiędzy współdziałaniem ACh z ChE, a związkiem FO z ChE polega na tym, że reakcja odwrotna-defosforylacja przebiega szczególnie wolno. W wyniku powstaje tzw. nieodwracalna inhibicja enzymu. Prawdopodobnie jedna z ważniejszych (być może główna) przyczyn powolności defosforylacji polega na tym, że zachodzi tu konieczność rozerwania związku alkilotlenowego, a nie acetylotlenowego jak w przypadku ACh, do czego enzym nie jest przygotowany.

Wśród pestycydów FO wyróżniamy również pochodne kwasów tiofosforowego (tiono) i dwutiofosforowego, w których tlen został zastąpiony przez siarkę. Związki te działają nieco inaczej aniżeli pozostałe związki FO, a mianowicie nie wywołują inhibicji ChE *in vitro*. Zjawisko powyższe można tłumaczyć tym, że do reakcji z enzymem jest konieczna polaryzacja grupy reagującej ( $C^+—O^-$ ) ( $P^+—O^-$ ), w wyniku której atom fosforu lub węgla uzyskując dodatni ładunek (proton) staje się zdolny do reakcji z ujemną nukleofilną grupą części esteratycznej enzymu.

Jednak związki te, jak wykazali Diggle i Gage (21) *in vivo* powodują inhibicję ChE dzięki ich aktywacji w wątrobie. Reakcja ta polega na utlenianiu z  $P=S$  do  $P=O$  tj. utlenianiu tiofosforanów do fosforanów.

Metcalf i March (za 45) podają, że aktywacja następuje wskutek przekształcania się przez ogrzanie tiofosforanów w związki tiolowe.

O'Brien (45) uważa, że mechanizm tej aktywacji przebiega następująco: pod wpływem enzymu z dwufosfopirydynonukleotydu tworzy się nadtlenek wodoru, który za pomocą katalazy utlenia nieznaną czynnik zawarty w mikrosomach. Ten z kolei utlenia paration w substancję antycholinesterazową paraokson.

Również nieco odmiennie kształtują się zatrucia schradanem, który *in vitro* działa słabo inhibicyjnie, natomiast *in vivo* wykazuje bardzo wysoką toksyczność. Du Bois i wsp. (23) oraz niezależnie Gardiner i Kilby (cyt. za 45) wykazali, że *in vivo* schradan przekształca się w silną truciznę. Proces ten zachodzi częściowo również *in vitro* pod wpływem skrawków wątroby, a czynnik aktywujący jest nietrwały i rozkłada się w temperaturze pokojowej w ciągu 48 godzin. Godny podkreślenia jest również fakt, że wątroby samców są kilkakrotnie aktywniejsze aniżeli samic i dlatego  $DL_{50}$  schradanu dla samców wynosi 7 mg/kg, a dla samic 27 mg/kg. Mechanizm tych procesów aktywacyjnych nie jest w pełni wyjaśniony.

Obserwacje kliniczne zatruc zwierząt związkami FO wskazywały początkowo (26), że np. pomiędzy dawką DFP, objawami zatrucia i aktywnością ChE tkanki mózgowej istnieje ścisła korelacja. Ustalono też współzależność pomiędzy stopniem unieczynnienia ChE w

poszczególnych narządach, a reakcją tych narządów np. oko-efekt miotyczny, ślimianki-ślimotok, węzeł współczulny szyjny-wypadnięcie trzeciej powieki.

Istnieją również fakty odmienne wskazujące na przeżywalność zwierząt po DFP mimo całkowitej inhibicji ChE w mózgu. Heymans i Jacob (31) wykazali, że w pewnych warunkach psom można podać dożylnie większe dawki DFP, po których mimo pełnej inhibicji ChE w mózgu, krwi i mięśniu serca nie zmienia się pobudliwość ośrodka oddechowego i ośrodka nerwu błędnego. Bajgar (14) zaś wykazał, że całkowite unieczynnienie AChE występuje w momencie śmierci tylko we frakcjach mikrosomalnych.

Te przeciwstawne spostrzeżenia można tłumaczyć błędami metodycznymi. Po wprowadzeniu związku do organizmu rozmieszcza się on w tkankach nierównomiernie, można więc przypuszczać, że jakaś część enzymu chroniona strukturą komórkową nie wchodzi w kontakt ze związkiem FO i tym samym unika inaktywacji. Jeżeli zaś tkankę rozdrobnimy i poddamy homogenizacji wówczas nastąpi dodatkowe unieczynnienie tego enzymu, a tym samym dane o inhibicji nie będą prawdziwe. Z kolei jeżeli nawet uniknie się tych błędów metodycznych to i tak nie wiemy, w których strukturach enzym został unieczynniony, a w których nie. W związku z powyższym ogromnie wzrasta znaczenie badań histochemicznych, które pozwalają zlokalizować enzym w danej tkance, nie dają niestety oceny ilościowej inhibicji enzymu.

Dotychczasowe badania histochemiczne (50) wykazują, że ChE układu nerwowego ośrodkowego po zatruciu związkiem FO nie jest unieczynniana równomiernie na całej długości tkanki, a ma charakter mozaikowy — istnieją odcinki unieczynnionej ChE na przemian z nieuczynnioną. Można więc przypuszczać, że inhibicja ChE w różnych morfologicznych częściach układu nerwowego, a nawet w różnych strukturach tego samego odcinka może mieć różne znaczenie w zachowaniu życiowo ważnych funkcji organizmu. Na pewno istnieją takie „strategiczne” punkty, w których inaktywacja enzymu jest równoznaczna z życiem, podczas gdy inhibicję enzymu w innych punktach organizm może znieść bez szkody. Dotyczy to nie tylko poszczególnych odcinków tkanki np. ośrodkowego układu nerwowego lecz również rozmieszczenia enzymu na poziomie pojedynczej komórki. Koelle (39) wykazał na węźle współczulnym szyjnym górnym u kur, że dla normalnej czynności komórki posiada znaczenie tylko ChE znajdująca się na jej powierzchni, enzym znajdujący się wewnątrz, jako zapasowy, nie bierze udziału w czynności komórki nerwowej. Nie wykluczone, że takie stosunki istnieją również w obrębie innych cholinergicznym struktur nerwowych.

Naturalnie, że wpływ inhibicyjny związków FO na różne typy cholinesteraz jest różny (1) i w znacznej mierze jest zależny od struktury chemicznej związku (52).

Prócz działania unieczynnającego ChE, związki FO mogą również bezpośrednio oddziaływać na tkankę. Przykładem może być znane od dawna zjawisko demielinizacji włókien nerwowych obwodowych i substancji białej rdzenia przedłużonego przez niektóre związki FO, czego efektem jest porażenie zwłaszcza kończyn dolnych. W USA np. w 1930 r. zanotowano tego rodzaju objawy u 100 osób. Powodem był wyciąg z imbiru, który zastosowano do wyrobu piwa domowego. Wyciąg ten był zanieczyszczony przez TOCP w ilości do 2% (45).

Należy również podkreślić, że obecnie niektórzy autorzy (cyt. za 60) uważają, że w mechanizmie toksycznego działania związków FO istotną rolę odgrywają efekty metaboliczne

prowadzące do tzw. biochemicznego szoku komórkowego.

Podsumowując przedstawione dane należy podkreślić, że pomimo wielu jeszcze niejasności w złożonych i zawitych mechanizmach współdziałania związków FO z ChE, nie ulega obecnie wątpliwości, że unieczynnianie ChE powoduje nagromadzenie się ACh, które jest głównym czynnikiem w patogenezie zatruc zwierząt związkami FO. Nagromadzenie się ACh w mięśniach gładkich drzewa oskrzelowego, jelit, pęcherza moczowego, żreńca powoduje występowanie objawów muskarynopodobnych; nagromadzenie się ACh w mięśniach prądkowanych i zwojach układu vegetatywnego jest przyczyną zmian nikotynopodobnych, a nadmierna ilość ACh w mózgu i rdzeniu kręgowym powodują zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego.

Adres autora: dr habil. Stefan Kossakowski, 24-100 Puławy, ul. Partyzantów 10 m. 12.

WOJCIECH STUDNICKI, JÓZEF FILAR, MAREK MUCHA, ANDRZEJ ZIMOWSKI

## Badania nad zastosowaniem Epontolu\*) do znieczulania ogólnego psów

Z Instytutu Chorób Niezakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Dane z piśmiennictwa wskazują, że Epontol jest bardzo dobrym środkiem dla wywołania krótkotrwałego znieczulenia ogólnego u ludzi (1). Jego wyższość nad innymi preparatami o podobnym działaniu polega na stosunkowo dużym bezpieczeństwie w stosowaniu jak również na bardzo krótkim śnie ponarkotycznym trwającym zaledwie kilka minut (3).

Oprócz badań na zwierzętach, które miały na celu określenie stopnia toksyczności tego preparatu przed wprowadzeniem go do użytku w medycynie, podejmowano również próby zastosowania Epontolu do narkozy u psów (2, 4).

Konieczność poszukiwania środków dla wywołania krótkotrwałej i bezpiecznej narkozy do praktyki ambulatoryjnej podyktowała podjęte badania tym bardziej, że preparat dotychczas znany pod nazwą Epontol ma być produkowany przez polski przemysł farmaceutyczny.

### Materiał i metody

W badaniach stosowano fabryczny 5% roztwór Epontolu w 10 ml ampułkach. Każda ampułka zawierała 0,5 g estru propylowego kwasu 3-metoksy-4-/N,N-dwuetylokarbamylometoksy/fenylpropylo-octowego w 5% roztworze buforowanego chlorku sodu z dodatkiem 16% solubilizator Mizellophor. Skrócona nazwa: propanidid.

\*) Epontol — preparat firmy Bayer.

Zwierzęta doświadczalne i materiał kliniczny podzielono na dwie grupy:

Grupa I — obejmowała 53 psy mieszańce, różnej płci, wieku i wagi, którym podawano do żyły dogłówniej podramienia lub żyły odstopowej 5% fabryczny roztwór Epontolu. Całą wyliczoną wg ciężaru ciała dawkę podawano szybko, bez zachowania jakichkolwiek środków ostrożności jakie są wskazane np. przy dożylniej iniekcji barbituranów. U każdego psa tej grupy wykonano od 1 do 3 znieczuleń ogólnych w odstępach od 1 dnia do 3 tygodni wg niżej podanego zestawienia:

W celu określenia optymalnej dawki Epontolu wykonano 66 znieczuleń ogólnych podając preparat w dawkach 40, 50, 60 i 80 mg/kg c.c.

U 12 psów tej grupy w chwili ustępowania znieczulenia ogólnego uzyskanego dawką 50 mg/kg c.c. narkozę przedłużano dożylną iniekcją połowy uprzednio stosowanej dawki Epontolu (25 mg/kg c.c.). Podawano go dwukrotnie z taką samą szybkością jak przy pierwszej iniekcji. Następnie 12 psów otrzymało Epontol w dawkach 40 lub 50 mg/kg c.c. przez trzy kolejne dni. U dalszych 12 psów zastosowano przedznieczulenie combelenem w ilości 0,5 mg/kg c.c. a później podano im Epontol w ilości 50 mg/kg c.c.

W celu określenia wpływu preparatu na nerki i wątroby u 3 psów, które otrzymały 60 mg/kg c.c. i u 10 psów, które otrzymały 40 do 50 mg/kg c.c. — przeprowadzono badania laboratoryjne moczu a w surowicy oznaczono poziom mocznika (wg metody Conwaya), kreatyniny (wg metody Folin-Wu) oraz aktywność enzymów aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (AlAT) (wg metody kolory-