

ALICJA KUREK, STEFAN KOSSAKOWSKI

## Aktywność neurotoksycznej esterazy u kur zatrutych DFP

Zakład Ochrony Radiologicznej i Badań Izotopowych, Instytut Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

### Summary

#### Activity of neurotoxic esterase in hens intoxicated with DFP

The activity of AChE in plasma, the brain and spinal cord and of NTE in the brain and spinal cord was determined after 1, 7, 14, 21 and 28 days in 30 hens (Leghorn) intoxicated once with DFP at a dose of 1 mg/kg b.w. The activity of AChE decreased during 24 h after intoxication in plasma to 12%, in the brain to 24% and in the spinal cord to 32%. Then the activity of this enzyme increased and after 28 days after intoxication was 107% in plasma, 84% in the brain and 91% in the spinal cord. The activity of NTE decreased after 24 h to 9% in the brain and to 18% in the spinal cord and then increased to attain 73% in the brain and 61% in the spinal cord after 28 days.

Pestycydy fosforoorganiczne (FO) stanowią istotne zagrożenie toksykologiczne dla ludzi i zwierząt. Efekty toksyczne tych związków mogą występować w dwóch kategoriach czasowych: wczesnej i opóźnionej. Wczesna toksyczność występująca w ciągu 1–40 godzin po zatruciu jest wynikiem unieczynniania cholinesteraz, zwłaszcza acetylocholinesterazy (AChE) z równoczesnym nagromadzeniem się acetylocholiny (ACh), prowadzącym do zaburzeń neurotransmisji (18, 22). Zaburzenia te charakteryzują się objawami muskaryno- i nikotynopodobnymi oraz zaburzeniami ośrodkowego układu nerwowego. Opóźniona neurotoksyczność, występująca po 7–21 dniach od zatrucia, charakteryzuje się inhibicją esterazy neurotoksycznej (NTE – 8, 9), co prowadzi do degeneracji długich aksonów w nerwach obwodowych i rdzeniu kręgowym i w konsekwencji do ataksji i paraliżu (1, 2).

Opóźniona neurotoksyczność pestycydów FO została uznana przez WHO za bardzo ważny problem (26) i dlatego w USA wprowadzono obowiązek testowania na neurotoksyczność wszystkich stosowanych pestycydów FO. Badań takich w Polsce dotychczas nie prowadzono, mimo tego że odtwarzane nieneurotoksyczne preparaty zagraniczne mogą stać się neurotoksyczne w wyniku nawet nieznacznych zmian technologicznych (7), np. Metrifonat i jego odpowiedniki Chlorofos i Foschlor. W związku z tym podjęto badania porównawcze aktywności AChE i NTE w mózgu i rdzeniu kręgowym kur po podaniu DFP w jednorazowej dawce neurotoksycznej.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 30 kurach rasy Leghorn, w wieku 9 miesięcy, o masie ciała 1,6–2,0 kg. Zwierzęta przez cały okres doświadczenia były żywione standardową dietą z nieograniczonym dostępem do wody. DFP (fluorofosforan dwuizopropylowy) rozpuszczany w mieszaninie glikolu propylenowego z alkoholem etylowym (1:1) w stężeniu 1 mg DFP/1 ml, podawano kurom domięśniowo w jednorazowej dawce 1 mg/1 kg m.c. Bezpośrednio przed podaniem DFP i w czasie 6–12 godz. po jego podaniu stosowano u kur atropinę w dawkach 10–30 mg/kg w zależności od obserwowanych zaburzeń oddechowo-kръżeniowych.

Oznaczanie aktywności AChE w osoczu, mózgu i rdzeniu kręgowym wykonano metodą Hestrina opisaną przez Juszkiewiczą i wsp. (16) po 1, 7, 14, 21 i 28 dniach. Oznaczanie NTE w mózgu i rdzeniu kręgowym wykonano w tych samych okresach metodą Johnsona (13). Zawartość białka w badanych tkankach oznaczano metodą Lowry i wsp. (21) stosując jako standard albuminę wołową.

Krew do badań aktywności AChE w osoczu pobierano z żyły skrzydłowej. Do badania aktywności AChE i NTE w mózgu i rdzeniu kręgowym kury zabijano przez dekapitację bez narkozy. Aktywność enzymów oznaczano bezpośrednio po pobraniu.

### Wyniki badań

Aktywność AChE w osoczu przed podaniem DFP wynosiła (w nM/min/ml)  $640 \pm 61$  (100%). Po podaniu DFP aktywność AChE zmniejszała się w ciągu 24 godz. do  $76,8 \pm 16$  (12%). Po 7 dniach aktywność AChE w osoczu wzrastała do  $537 \pm 49$  (84%), a w następnym okresie doświadczenia wzrastała w dalszym ciągu, osiągając po 28 dniach  $685 \pm 74$  (107%).

Aktywność AChE w homogenatach mózgu (ryc. 1) wynosiła (w  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$  tkanki)  $22,1 \pm 2,6$  (100%), a po podaniu DFP aktywność AChE zmniejszała się w ciągu 24 godz. do  $5,3 \pm 0,8$  (24%). W następnym okresie doświadczenia aktywność wzrastała osiągając po 7 dniach  $9,9 \pm 0,9$  (46%) i po 28 dniach  $18,6 \pm 1,7$  (84%).

Aktywność AChE w homogenatach rdzenia kręgowego (ryc. 1) wynosiła ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$  tkanki) przed podaniem DFP  $5,1 \pm 0,6$  (100%). W ciągu 24 godz. po podaniu DFP aktywność AChE spadała do  $1,6 \pm 0,3$  (32%). Z kolei następował wzrost AChE, której aktywność wynosiła po 7 dniach  $2,1 \pm 0,5$  (49%), a po 28 dniach  $4,6 \pm 0,8$  (91%).

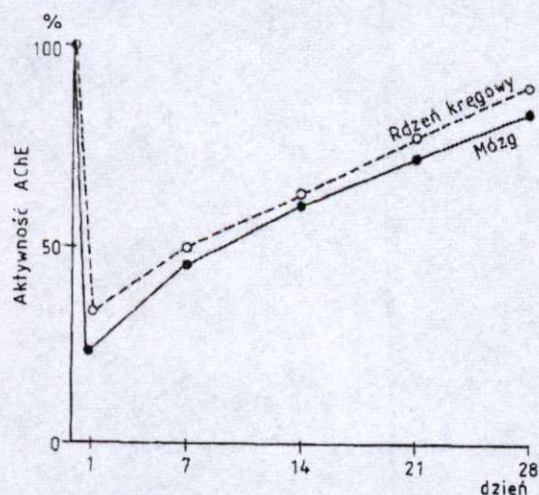
Aktywność NTE w homogenatach mózgu (ryc. 2) wynosiła (w nM/min/g tkanki) przed podaniem DFP  $2381 \pm 224$  (100%). W ciągu 24 godz. po podaniu DFP aktywność NTE spadała do  $214 \pm 70$  (9%). W dalszym okresie następował wzrost aktywności, która po 7 dniach wynosiła  $972 \pm 154$  (41%), a po 28 dniach  $1907 \pm 252$  (73%).

Aktywność NTE w homogenatach rdzenia kręgowego (ryc. 2) wynosiła (w nM/min/g tkanki) przed podaniem DFP  $444 \pm 66$  (100%). W ciągu 24 godz. po podaniu DFP aktywność zmniejszała się do  $80 \pm 12$  (18%). W następnym okresie aktywność wzrastała po 7 dniach do  $124 \pm 45$  (28%), a po 28 dniach  $271 \pm 78$  (61%).

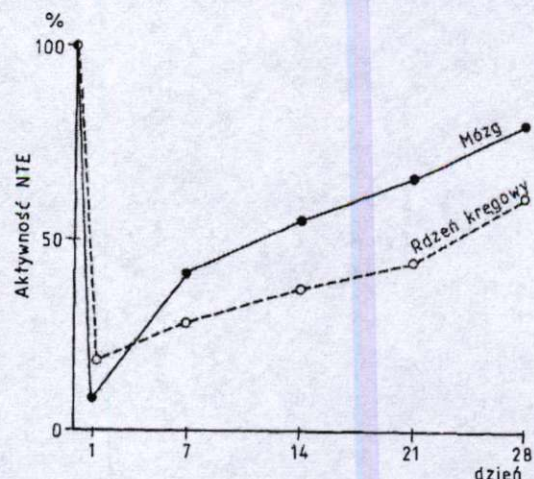
Zawartość białka w homogenacie mózgu wynosiła  $12,8 \pm 0,9$  mg%, a w homogenacie rdzenia kręgowego  $9,8 \pm 1,0$  mg%.

### Omówienie

Badania nad neurotoksycznością pestycydów FO wykazały, że zjawisko to pozostaje w związku z inhibicją specyficznego neurotoksycznego białka (8), które ze względu na właściwości esteratyczne nazwano neurotoksyczną esterazą (12). Dalsze badania wykazały, że nie wszystkie inhibitory NTE działają neurotoksycznie (11). Do neurotoksycznych zalicza się fosfony, amidofosfony i fosfony, podczas gdy sulfoniany, fosfiniany i karbaminiany nie są neurotoksyczne. Istotą różnic



Ryc. 1. Wpływ DFP na aktywność AChE w tkance nerwowej kur



Ryc. 2. Wpływ DFP na aktywność NTE w tkance nerwowej kur

w działaniu tych związków jest proces starzenia się kompleksu enzym-inhibitor, który występuje również przy unieczynnianiu cholinesteraz (4).

Badania przeprowadzono na kurach, ponieważ znacznie wcześniej ustalono, że aktywność NTE w mózgu u ludzi jest podobna jak w mózgu kur, które są zwierzęciem modelowym w tego rodzaju badaniach (19). Ustalono też, że kury w wieku do 100 dni nie są wrażliwe na działanie neurotoksycznych związków FO (10). Również niewrażliwe są króliki, świnki morskie, szczury i myszy, natomiast wrażliwe są psy, koty, cielęta, owce i kaczki (wg 17).

DFP zaliczany jest do klasycznych wysokotoksycznych związków FO powodujących unieczynnianie zarówno cholinesteraz, jak i esterazy neurotoksycznej. Dlatego w badaniach nad jego neurotoksycznością stosuje się we wczesnej fazie zatrucia (muskarynowej) osłonę atropinową (2).

Istota oznaczania NTE polega na preinkubowaniu homogenatów badanych tkanek z Paraoxonem (fosforan O'0 dietylo 0-4 p-nitrofenylo) i Mipafoxem (fluorek N'N bis-izopropylodifosforodwuamidowy) zsyntetyzowanym wg Johnsona (13). Stosuje się je celem zablokowania występujących w tych tkankach cholinesteraz przed podaniem substratu. Różnice między aktywnościami przed i po podaniu substratu stanowią aktywność NTE.

DFP w jednorazowej dawce 1 mg/kg powodował 70–80% inhibicję AChE w osoczu, mózgu i rdzeniu kręgowym, po której następował, w wyniku resyntezy AChE, wzrost aktywności tego enzymu. Powyższe zjawisko jest typowe dla zatruc związkami FO zwierząt i ludzi (5). DFP powodował również inhibicję NTE w mózgu i rdzeniu kręgowym do 10% jej aktywności fizjologicznej z następującym po 7 dniach wzrostem aktywności do 40–50%. Wzrost ten był efektem połowicznej resyntezy NTE w mózgu i rdzeniu kręgowym opisaną przez wielu autorów (3, 8, 23). Podobne zmiany aktywności NTE stwierdzano przy zatruciach wysokotoksycznymi związkami FO typu sarin, soman i tabun (6).

Jeśli chodzi o efekty kliniczne spowodowane inhibicją NTE, to niektórzy autorzy (15, 25) podają, że inhibicja tego enzymu w granicach 80–90% powoduje ciężkie neuropatie. Inni uważają (14, 23), że pojedyncza dawka związku FO powodująca inhibicję około 75% NTE wywołuje ciężką neuropatię. Z kolei Lotti i wsp. (20) opisali ciężki przypadek neuropatii u mężczyzny przy 60% inhibicji NTE.

Należy podkreślić, że problem neuropatii jako opóźnionych następstw zatruc niektórymi związkami FO nie został doty-

czas całkowicie poznany. Nieznana jest normalna, fizjologiczna funkcja NTE w organizmie. Również nie jest znana kolejność molekularnych i komórkowych procesów zachodzących w okresie kilku dni po ekspozycji neurotoksycznych związków FO. Nie wiadomo też, dlaczego po 7–21 dniach pojawia się degeneracja długich aksonów wraz z objawami neuropatii, kiedy w tym okresie około 50% NTE jest zre-syntetyzowana (4, 11, 24).

Wątpliwości te nie umniejszają jednak faktu, że mechanizm powstawania neuropatii po zatruciach neurotoksycznymi związkami FO jest związany z aktywnością NTE. Oznaczanie aktywności NTE jest obecnie klasycznym testem określania neurotoksyczności związków FO, a zastosowana przez nas metoda Johnsona (13) jest prostsza i bardziej selektywna od metody wcześniej opracowanej przez tego autora (8).

#### Piśmiennictwo

1. Abou-Donia M. B.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 511, 1981.
2. Baron R. L.: Ann. Rev. Entomol. 26, 23, 1981.
3. Caroli S., Lotti M.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 62, 498, 1982.
4. Clothier B., Johnson M. K.: Biochem. J. 177, 549, 1979.
5. Golikow S. N., Rosengart W. I.: Farmakologia i toksikologia fosforo-organicznych sojediniy. Medgiz, Moskwa 1960.
6. Gordon J. J. i wsp.: Arch. Toxicol. 52, 71, 1983.
7. Holmstedt B., Nordaren J., Sandoz M., Sundwall A.: Arch. Toxicol. 41, 3, 1978.
8. Johnson M. K.: Biochem. J. 114, 711, 1969.
9. Johnson M. K.: Arch. Toxicol. 34, 259, 1975.
10. Johnson M. K., Barnes J. M.: Biochem. Pharmacol. 19, 3045, 1970.
11. Johnson M. K.: Arch. Toxicol. 34, 259, 1975.
12. Johnson M. K.: Biochem. Pharmacol. 24, 797, 1975.
13. Johnson M. K.: Arch. Toxicol. 37, 113, 1977.
14. Johnson M. K.: Neurobehavioral Toxicol. Teratol. 4, 759, 1982.
15. Johnson M. K., Lotti M.: Toxicol. Lett. 5, 99, 1980.
16. Juskiewicz T., Mizak B., Paleolog A.: Medycyna Wet. 22, 303, 1966.
17. Kossakowski S., Żuk M.: Medycyna Wet. 38, 265, 1982.
18. Kibiakow A. W.: Chimičeskaja pieredača nervnogo vozbuždienija. Nauka, Moskwa, 1964.
19. Lotti M., Johnson M. K.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 16, 461, 1970.
20. Lotti M., Johnson M. K.: Arch. Toxicol. 45, 263, 1980.
21. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
22. O'Brien A. D.: Toxic Phosphorus Esters. Acad. Press, London 1960.
23. Olajos E. J., Rosenblum J.: Ecotoxic. Environ. Safety 3, 18, 1979.
24. Olajos E. J., De Caprio A. P., Rosenblum J.: Ecotoxic. Environ. Safety 2, 383, 1978.
25. Soliman S. A.: J. Toxicol. Environ. Hlth. 10, 907, 1982.
26. WHO Rep. ser. nr 592 and FAO Plant Growth Prot. ser. nr 1, p. 11, 1976.

Adresa autora: dr Alicja Kurek, ul. Błękitna 7, 20-468 Lublin