

Tadeusz MIERZEJEWSKI, Beata SŁOWIKOWSKA,
Alicja KUREK

**Aktywność lipolityczna w osoczu krwi u psów
po ostrym zatruciu Foschlorem**

Липолитическая активность кровяной плазмы после острого отравления
Фосхлором

Lipolytic Activity in Dog's Blood Plasma after Acute Intoxication with Foschlor

Związki fosforoorganiczne (zfo) — inhibitory „enzymów serynowych” prowadzą w organizmie zwierząt do zaburzeń metabolicznych i objawów klinicznych, związanych z gromadzeniem się endogennej acetylocholino, powstałej w wyniku unieczynnienia acetylohydrolazy acetylocholino E.C.3.1.1.7. (AcChE) i acylohydrolazy acylocholino E.C.3.1.1.8. (ChE). Właściwości tej przypisywany jest wpływ na homeostazę i główny mechanizm zatrucia (1, 8—10, 13—19).

Enzymy lipolityczne, podobnie jak ChE, są aktywnie wydzielane do układu krążenia i służą fizjologicznej funkcji krwi (6). Wykazano, że *in vitro* zfo hamują lipolizę (3—5, 12), a mechanizm tej inhibicji, jak przypuszcza Aldrige (2), jest taki sam jak w przypadku ChE. Przypuszcza się też, że inhibicja lipolizy przez zfo — Paraoxon może być przyczyną zejść śmiertelnych w późniejszych stadiach intoksykacji (5), a także, że śmierć embrionów pasożytów, u których nie wykrywano ChE, może być wynikiem zahamowania lipolizy przez zfo (12). Kontrowersyjne są wyniki badań przeprowadzone na brojlerach, u których przy ostrym i chronicznym zatruciu Ekatinem stwierdzono hiperlipidemię, powstałą w wyniku zaburzeń metabolicznych ustroju z lipolizy tłuszczów zapasowych (7). Ponieważ ptaki wykazują znaczną tolerancję na zfo (7), a u ssaków zakres manifestacji klinicznych po podaniu zfo zależy od wielu czynników i często dawki lecznicze zfo powodują ciężkie objawy zatrucia (16), postanowiono zbadać aktywność lipolityczną osocza krwi u psów w warunkach krytycznych, tj. po jednorazowym podaniu letalnej dawki zfo — Foschlora.

Foschlor (Dipterex, Trichlorofon) 0.0-dwumetylo-1-hydroksy-2.2.2.-trójchloroetylofosfonian-(PCI) stosuje się do zwalczania pasożytów u roślin i zwierząt. Zagadnieniami toksyczności PCI u zwierząt zajmuje się Instytut Nauk Fizjologicznych AR w Lublinie (10, 15—19).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 11 psach różnych ras w wieku 1–2 lat, ciężar ciała 12–20 kg. Podzielono je na dwie grupy: doświadczalną i kontrolną. Psom obydwu grup w narkozie eunarkonowej (0,3 ml Eunarkonu/kg ciężaru ciała) odsłaniano tętnicę udową, z której pobierano na krystaliczną heparynę próbki krwi do oznaczeń. W czasie 0 tuż po podaniu narkozy pobierano 30 ml krwi w celu oznaczenia aktywności wyjściowej enzymu. Następnie 9 psom z grupy doświadczalnej podano domięśniowo PCl (rozpuszczony w glikolu propylenowym i etanolu w stosunku 1:1:1) w jednorazowej dawce 500 mg PCl/kg ciężaru ciała (DL₅₀₀). Po upływie 15, 60 i 120 min. od chwili iniekcji PCl pobierano z tętnicy 30 ml krwi do oznaczeń.

Dwa psy oznaczone K₁ i K₂ stanowiły kontrolę. Psom tym podano Eunarkon. Psa K₁ skrwawiano. Do 800 ml krwi (z heparyną) dodano 400 mg PCl, krew umieszczano w termostacie w temp. 37°C, a następnie po upływie 15, 60 i 120 min. pobierano 30 ml krwi do oznaczeń. U psa K₂ pobierano z tętnicy udowej w czasie 15, 60 i 120 min. 30 ml krwi, do której natychmiast dodawano po 30 mg PCl.

Obserwacje w grupie kontrolnej miały na celu ustalenie: 1) czy PCl wywiera bezpośredni wpływ na układ lipolityczny osocza (K₁, K₂); 2) czy kilkakrotne pobieranie krwi do oznaczeń w stosunkowo krótkim czasie powoduje zmiany w aktywności lipolitycznej osocza (K₂) oraz 3) czy zagęszczenie krwi spowodowane ucieczką wody z układu krążenia w wyniku wzmożonego wydalenia płynów (ślinienie, łzawienie, odruchowe oddawanie kału i moczu) przez psy po zatruciu PCl wywołuje zmiany w systemie lipolizy osocza (K₁). Ze względu na to, że w badaniach stosowano PCl rozpuszczony w glikolu propylenowym i etanolu (rozpuszczalniki organiczne mogą w formach użytkowych zło wpływać na ich toksyczność *in vivo*), w układzie doświadczeń należało przyjąć jako preparat czynny pełny roztwór PCl i zrezygnować z jeszcze jednej kontroli, która mogłaby się wydawać potrzebna (a mianowicie psa, któremu podano by mieszaninę glikolu propylenowego i etanolu bez PCl).

Aktywność lipolityczną osocza krwi ALp oznaczano w oparciu o metodę opisaną przez Sliwińską. Skład mieszaniny reagującej i oznaczenia przeprowadzono ściśle według wskazań autora metody (11). Za jednostkę aktywności lipolitycznej przyjęto proponowaną przez Sliwińską jednostkę dla lipazy, tj. 0,1 ml 0,01 N NaOH, odpowiada to mikrorównoważnikowi (μ Eq). ALp wyrażano w μ Eq/min./ml. Dokładność metody sprawdzano przeprowadzając 10 oznaczeń tej samej próbki. Współczynnik zmienności tych wyników wynosił 15,7%. Wszystkie oznaczenia przeprowadzano 3-krotnie. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną tych oznaczeń. Odczynniki do oznaczeń (poza oliwą z oliwek i Foschlorem) zastosowano czyste p.a. Foschlor otrzymano z Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego w Gorzowie Wlkp.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Jednorazowa domięśniowa iniekcja PCl (w dawce 500 mg/kg ciężaru ciała) powodowała u psów po upływie 10–25 min. od momentu podania pestycydu objawy zatrucia o działaniu muskarynowo-nikotynowym: łzawienie, obfity ślinotok, wyciek śluzowy z nosa, wzmożoną perystaltykę, odruchowe oddawanie moczu czasem kału, włóknikowe drżenie mięśni,

ich toniczno-kloniczne skurcze oraz zaburzenia rytmu serca i oddechów. Zgon psów następował po upływie 2—3 godzin.

Rezultaty oznaczeń ALp w osoczu krwi wszystkich użytych do badań psów zamieszczono w tab. 1. Na podstawie danych można stwierdzić, że 1) u wszystkich psów grupy doświadczalnej ALp osocza krwi rośnie w miarę upływu czasu doświadczenia; 2) wartości liczbowe ALp w czasie 0'

Tab. 1. Wartości aktywności lipolitycznej ($ALp = \eta Eq/min./ml$) w osoczu krwi u psów po ostrym zatruciu Foschlorem (warunki reakcji wg opisu podanego w metodach) Level of the lipolytic activity ($ALp = \eta Eq/min./ml$) in blood plasma in dogs after acute poisoning with Foschlör (conditions of the reaction as described in methods)

Nr	Aktywność specyficzna w czasie			
	0'	15'	60'	120'
1	315,5	386,8	833,3	2666,0
2	77,3	125,0	154,6	184,5
3	21,6	58,6	114,2	398,2
4	50,0	93,3	213,3	276,6
5	66,6	183,3	700,0	1360,0
6	56,6	183,3	260,0	243,0
7	26,6	80,0	233,3	286,6
8	36,6	56,6	213,3	260,0
9	36,6	123,3	206,6	290,0
10 _{k1}	130,0	136,0	130,0	140,0
11 _{k2}	168,0	166,6	160,0	166,6

wykazują znaczny rozrzut osobniczy oraz różny u poszczególnych psów wzrost ALp w czasie doświadczenia; 3) PCL nie wpływa bezpośrednio na ALp osocza krwi (K_1 i K_2); 4) pobieranie 30 ml krwi w stosunkowo krótkim czasie (K_2) oraz utrata wody i zagęszczenie krwi (K_1 i K_2) nie powodują zmian ALp w osoczu krwi u psów. Konfrontację wyników dotyczących istotności zmian ALp po podaniu psom PCL przeprowadzono stosując analizę wariancji w klasyfikacji pojedynczej (20). W celu zredukowania strat informacji o reakcji psów wynikającej ze zmienności osobniczej dane tab. 1 zostały przekształcone, a mianowicie wartości pomiaru dla każdego psa wyrażone zostały w % ALp w czasie 0 (tab. 2). Analizę wariancji dla ALp przedstawia tab. 3. Z danych tab. 2 i 3 analizowanych przy pomocy metody Tuke'a (20) — porównywania kilku średnich — wynika, że na poziomie istotności $\alpha = 0,001$ zmiany ALp są wysoce istotne i występują między każdymi dwoma sąsiednimi czasami oznaczeń.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazały, że ciężkie zatrucie PCL prowadzi u psów do zaburzeń w ALp osocza krwi. Wyrazem ich jest nasilający się w miarę upływu czasu od chwili podania pestycydu statystycznie wysoce istotny ($\alpha = 0,001$) wzrost ALp. Na wyniki ALp otrzymane w niniejszej pracy rzutuje w głównej mierze aktywność hy-

Tab. 2. Wartości aktywności lipolitycznej (ALp) jako procent ALp w czasie 0'
 Level of the lipolytic activity (ALp) as per cent of the ALp in 0' time

Nr	Czas		
	15'	60'	120'
1	123	264	843
2	162	200	239
3	271	527	1 838
4	187	427	553
5	275	1 050	2 040
6	324	459	429
7	300	875	1 075
8	155	582	709
9	336	564	791
Suma	2 133	4 948	8 517
Średnia	237	549,78	946,33
Suma kwadratów	557 305	3 305 380	11 081 451

Tab. 3. Analiza wariancji ALp
 Variant analysis of ALp

Źródło zmienności	v	nS ²	V	F ₀	F ₀ 0,001
Czas (w min.)	v _{ob} =2	2 274 720,07	1 137 360,04	7,461	3,745
Błąd	v _c =24	3 658 393,56	152 433,07	—	—
Całość	v _v =26	5 933 113,63	—	—	—

drolazy estrów glicerynowych (substrat wysycający mieszaninę reagującą — oliwa z oliwek), regulowanej przez system cykazy adenilowej, kinaz białkowych i fosfodwuesterazy, który konwertuje enzym nieaktywny w aktywny ufosforowany. Na podstawie naszych badań można przypuszczać, że indukcja ALp w osoczu krwi u psów po letalnej dawce PCL nie powstaje w wyniku bezpośredniej aktywacji przez pestycyd systemu fosforylującego hydrolazę estrów glicerynowych ani też przez bezpośrednie ufosforowanie lipazy przez PCL. U psów kontrolnych K₁ i K₂ *in vitro* nie obserwowano zmian w ALp. Można zatem sądzić, że PCL *in vivo* wpływa tylko pośrednio na mechanizm fosforylacji enzymu manifestującego się wzrostem ALp w osoczu krwi.

Odmienne wyniki od naszych otrzymano w badaniach prowadzonych przy zastosowaniu Paraoxonu. Wykazano w nich, że hamuje on lipolizę w komórkach tłuszczowych (4, 5) i embrionach pasożytów (12). Inhibicję lipolizy przypisano bezpośredniemu współdziałaniu lipazy trójglicerydowej z pestycydem, ponieważ Paraoxon nie hamował funkcji enzymów fosforylujących białka (5).

PCL *in vitro*, jak wykazały nasze oznaczenia, nie hamował lipolizy w osoczu krwi psów (K_1 i K_2), nie współdziałał więc bezpośrednio z lipazą trójglicerydową osocza. Być może odmienne jest działanie PCL od Paraoxonu na hydrolazę estrów glicerynowych. Trudno jest na podstawie naszych badań ustosunkować się jednoznacznie do tego, tym bardziej że badania prowadzono w różnych „układach biologicznych” na niefrakcjonowanym materiale enzymatycznym. Natomiast *in vivo* (grupa psów doświadczalnych) otrzymane przez nas wyniki przemawiają za obserwacjami poczynionymi przez Kądziołkę i wsp. (7), którzy wykazali w osoczu krwi brojlerów po ostrym zatruciu Ekatinem hiperlipidemię powstałą — jak sądzą autorzy — w wyniku lipolizy tłuszczów zapasowych, wyrażoną w osoczu krwi ptaków poprzez znamienny wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych (o 135,24%), a także tłuszczu całkowitego i cholesterolu estrowego.

Akceleracja systemu fosforylującego hydrolazę estrów glicerynowych pozostaje pod wpływem wielu czynników regulujących, takich jak: adrenalina, noradrenalina, glukagon, ACTH, TSH, LH, sekretyna, serotonina, L-tyroksyna, hydroksykortykosteron i prostoglandyny. Uzyskane przez nas wyniki nie upoważniają do udzielenia odpowiedzi na pytanie, który z wyżej wymienionych hormonów pobudza proces fosforylacji lipazy, manifestujący się w osoczu krwi psów zatrutych PCL indukcją ALp. Pozwalają natomiast przypuszczać, że szybki i znaczny wzrost ALp w układzie krążenia — niezależnie od tego jak powstaje, w którym miejscu i czy ma charakter pierwotny lub wtórny — jest reakcją organizmu w stanie intoksykacji PCL, która może informować o stopniu zatrucia oraz być pomocnym wskaźnikiem w rokowaniu.

PISMIENNICTWO

1. Aldrige W. N.: Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. *Biochem. J.* **46**, 451, 1950.
2. Aldrige W. N.: Inhibition of erythrocyte cholinesterase by tri-esters of phosphoric acid. III. Nature of the inhibitory process. *Biochem. J.* **54**, 442, 1953.
3. Buchet J. P., Lauwerys R.: Inhibition of rat heart diolein hydrolase and brain acetylcholinesterase by organophosphate esters *in vitro*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **218**, 369, 1970.
4. Dinnendahl V., Peters H. D., Helm K. U., Schonhofer P. S.: (1) Effect of paraoxon on the lipolytic system of fat cells. *Naunyn Schmiedeborg's Arch. Pharmacol.* **274**, 28, 1972.
5. Dinnendahl V., Peters H. D., Helm U. K., Schonhofer P. S.: Studies on the mechanism of the antilipolytic effect of paraoxon. *Arch. Toxikol.* **30**, 175, 1973.
6. Harper H. A.: Zarys chemii fizjologicznej. PZWL, Warszawa 1972.

7. Kądziołka A., Mierzejewski T., Ruciński T., Kostarz T.: Aktywność enzymatyczna krwi, osocza krwi i tkanki wątrobowej zwierząt po zatruciu związkami fosforoorganicznymi. Część II. Wpływ ostrego i przewlekłego zatrucia Ekatinem na poziom związków tłuszczowych osocza krwi brojlerów. *Annales UMCS, sect. DD*, **29**, 134, 1974.
8. Kossakowski S.: Mechanizm działania pestycydów fosforoorganicznych na organizm zwierzęcy. I. Unieczynnianie cholinesteraz w zatruciach pestycydami fosforoorganicznymi. *Medycyna Wet.* **30**, 400, 1974.
9. Kossakowski S.: Mechanizm działania pestycydów fosforoorganicznych na organizm zwierzęcy. II. Reaktywacja cholinesteraz w zatruciach pestycydami fosforoorganicznymi. *Med. Wet.* **30**, 541, 1974.
10. Kossakowski S., Patyra S.: Elektrokardiogram królików zatrutych Foschlorem. *Medycyna Wet.* **33**, 677, 1977.
11. Kokot F.: Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice. PZWL, Warszawa 1969.
12. Krysan J. L., Guss P. L.: Paraoxon inhibition of an insect egg lipase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **239**, 349, 1971.
13. Lis T., Mierzejewski J.: Wpływ Foschloru na aktywność lizozymu surowicy krwi świń morskich. *Medycyna Wet.* **30**, 105, 1974.
14. Mierzejewski T., Kądziołka A., Słowikowska B.: Aktywność proteolityczna osocza krwi, krwi hemolizowanej i homogenatów wątroby brojlerów w ostrym i przewlekłym zatruciu Ekatinem. *Annales UMCS*, (w druku).
15. Mierzejewski T., Słowikowska B., Wasilewska B.: Aktywność proteolityczna w osoczu krwi i krwi hemolizowanej u psów po ostrym zatruciu Foschlorem. *Pol. Arch. Wet.* (w druku).
16. Patyra S., Kurek A., Kossakowski S.: Badania hematologiczne u psów po ostrym zatruciu Foschlorem. *Med. Wet.* **30**, 478, 1974.
17. Patyra S., Kossakowski S., Kurek A.: Wpływ inhibitorów esterazy cholinowej z grupy pestycydów fosforoorganicznych na hemadynamikę u zwierząt. I. Reakcje układu krążenia i oddechowego u królików po ostrym zatruciu Foschlorem. *Pol. Arch. Wet.* **19**, 161, 1976.
18. Patyra S., Kossakowski S., Kurek A.: Wpływ inhibitorów esterazy cholinowej z grupy pestycydów fosforoorganicznych na hemodynamikę u zwierząt. II. Reakcje układu krążenia i układu oddechowego u psów po ostrym zatruciu Foschlorem. *Pol. Arch. Wet.* **19**, 275, 1976.
19. Patyra S., Kurek A., Kossakowski S.: Badania hematologiczne u psów po ostrym zatruciu Foschlorem. *Medycyna Wet.* **30**, 478, 1974.
20. Rao C. R.: Linear statistical inference and its applications. New York 1968.

Pierwsza wersja pracy wpłynęła 24 VI 1977 r., druga, poprawiona 20 V 1980 r.

РЕЗЮМЕ

Исследовано активность триглицеридовой липазы (ALp) в кровяной плазме собак при эунарконовом наркозе (0,3 Эунаркона/кг веса тела) после однократной внутримышечной дозы Фосхлора (500 мг Фосхлора/кг в.т. DL₁₀₀). Полученные результаты показали, что острое отравление Фосхлором вызывает ALp расстройство в системе кровообращения, вследствие которого с момента применения пестицида, выступает статистически существенный ($\alpha=0,001$) рост активности энзима. Индукция ALp в кровяной плазме не возникает в результате непосред-

ственной активности энзима через пестицид, но выступает вне кровообращительной системы. Предлагается, что быстрый и значительный рост ALp в кровяной плазме может помочь определить степень отравления при помощи так называемого ориентировочного диагностического метода.

SUMMARY

Examinations were made of the activity of Triglyceride lipase (ALp) in the blood plasma of dogs anaesthetized with Eunarcon (0.3 ml of Eunarcon/kg b.w.) after a single intramuscular lethal injection of Foschlor in a dose of 500 mg/kg of body weight — DL_{100} . The observations showed that acute intoxication with Foschlor resulted in disorders of ALp in the circulatory system. They were manifested by a statistically significant increase of the enzyme activity ($\alpha=0.001$) following pesticide application. ALp induction in the blood plasma does not occur as a direct result of the enzyme activation by pesticide — it takes place outside the circulatory system. A rapid and significant ALp increase in the blood plasma is supposed to supply information about the degree of intoxication and be one of possible diagnostic methods.