

Bogdan Koczanowski*

Zmiany aktywności acetylocholinesterazy oraz zawartości glutationu w wybranych narządach myszy po podaniu dichlorvosu

Streszczenie

Badania przeprowadzono na dorosłych samcach myszy białej, którym dootrzewnowo w dawkach jednorazowych (6 mg/kg i 10 mg/kg) podawano dichlorvos. W mózgu i mięśniu (*musculus quadriceps femoris*) oznaczano aktywność AchE metodą Ellmana (1961), natomiast w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach zawartość zredukowanego glutationu metodą Ellmana (1959). Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała zróżnicowaną odpowiedź badanych narządów na zastosowany pestycyd. Zmiany aktywności AchE i zawartości GSH w badanych tkankach są zależne od dawki. Procent hamowania aktywności AchE w mózgu i mięśniu po 1 godzinie od czasu ekspozycji był najwyższy. W przypadku GSH zanotowane zmiany miały zróżnicowany przebieg zależny generalnie od dawki insektycydu.

Wstęp

Związki fosforoorganiczne o właściwościach antycholinesterazowych nieodwracalnie hamują aktywność cholinesterazową, powodując nadmierną aktywność cholinergiczną w miejscach cholinoceptywnych

*Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie

tkanki nerwowej i narządów efektorycznych. Podostra intoksykacja tymi związkami jest kojarzona głównie ze zmianami behawioralnymi i kognitywnymi. Symptomy zatrucia ostrego związkami fosforoorganicznymi występują od kilku minut do 2–3 godzin i trwają 1–5 dni (Gupta i Salunkhe 1985).

Zdaniem Wilson (1987) insektycydy tej grupy wywołują także późny efekt neuropatyczny. Zaburzenia funkcjonalne w wyniku intoksykacji są klasyfikowane generalnie do zaburzeń motorycznych (ataksja). Odwrócenie zmian jest powolne i nie zawsze całkowite. Hamowanie acetylocholinesterazy odgrywa kluczową rolę w patomechanizmie intoksykacji insektycydami fosforoorganicznymi. Zredukowany glutation natomiast jest istotnym ogniwem zarówno procesu toksyfikacji, jak i detoksykacji. Glutation uczestniczy w transformacji ksenobiotyków, tworząc z nimi koniuganty. W wyniku procesów sprzęgania z glutationem, powstałe koniuganty ulegają dalszemu metabolizmowi do kwasów merkapturowych, które ulegają wydaleniu z organizmu (Mikstacka 1988). Zmiany w koncentracji tego trójpeptydu mogą odzwierciedlać ogólny stopień zaburzeń metabolicznych. W związku z powyższym postanowiono określić zawartość GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach oraz aktywność AchE w mózgu i mięśniu po podaniu insektycydu fosforoorganicznego dichlorvosu.

Materiał i metodyka badań

Badania przeprowadzono na 50 czteromiesięcznych samcach myszy o średniej wadze 25 g, które były hodowane w jednakowych warunkach pod względem oświetlenia LD 12:12. Wszystkie użyte do badań zwierzęta podzielono na jedną grupę kontrolną i cztery doświadczalne, po 10 osobników w każdej. Myszy pierwszej grupy doświadczalnej otrzymały dootrzewnowo w dawce jednorazowej 6 mg/kg dichlorvosu. Zwierzęta drugiej grupy doświadczalnej otrzymały w dawce jednorazowej 10 mg/kg tego insektycydu. trzecią i czwartą grupę eksperymentalną stanowiły zwierzęta otrzymujące dootrzewnowo dichlorvos w dawce jednorazowej odpowiednio 6 i 10 mg/kg masy ciała. Myszy pierwszej i drugiej grupy doświadczalnej zabijano po 1 godzinie od

czasu podania insektycydu, natomiast zwierzęta trzeciej i czwartej grupy eksperymentalnej po 3 godzinach od czasu ekspozycji. Zwierzęta grupy kontrolnej i grup doświadczalnych zabijano przez dekapitację, pobierano krew, mózg, wątrobę, nerki i mięsień (*musculus quadriceps femoris*). W mózgu i mięśniu oznaczano aktywność acetylocholinesterazy metodą Ellmana (1961), natomiast w supernatantach krwi, wątroby, mózgu i nerek zawartość zredukowanego glutationu metodą Ellmana (1959). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej obliczając test „t” Studenta.

Wyniki

Dane liczbowe dotyczące wpływu jednorazowych dawek insektycydu fosforoorganicznego dichlorvosu na zmiany aktywności AchE w mózgu i mięśniu oraz zawartości GSH w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach zestawiono w tabelach 1 i 2 oraz zilustrowano graficznie na ryc. 1–5.

Tab. 1. Zmiany aktywności acetylocholinesterazy (AchE) w mózgu i mięśniu szkieletowym po 1 i 3 godzinach od iniekcji dichlorvosu w jednorazowych dawkach 6 i 10 mg/kg

Aktywność AchE	Dawka	Czas po podaniu dichlorvosu (godz.)		
		0	1	3
MÓZG	6	12,97 ± 1,83 (100)	8,84 ± 1,67* (68,0)	10,07 ± 1,28* (77,9)
	10	12,97 ± 1,83 (100)	7,13 ± 1,14* (54,9)	9,16 ± 0,60* (70,6)
MIĘSIEŃ	6	10,29 ± 1,53 (100)	6,69 ± 0,79* (65,0)	7,91 ± 1,05 (76,8)
	10	10,29 ± 1,53 (100)	6,69 ± 0,75* (58,8)	6,81 ± 0,92* (66,1)

Wartość $x \pm SE$ z 10 osobników, wartości w nawiasach wskazują na procentowe zmiany badanego parametru w stosunku do wartości kontrolnych (100%)

*Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami zwierząt kontrolnych i wartościami zwierząt eksponowanych na dichlorvos w różnych przedziałach czasu ($p \leq 0,01$)

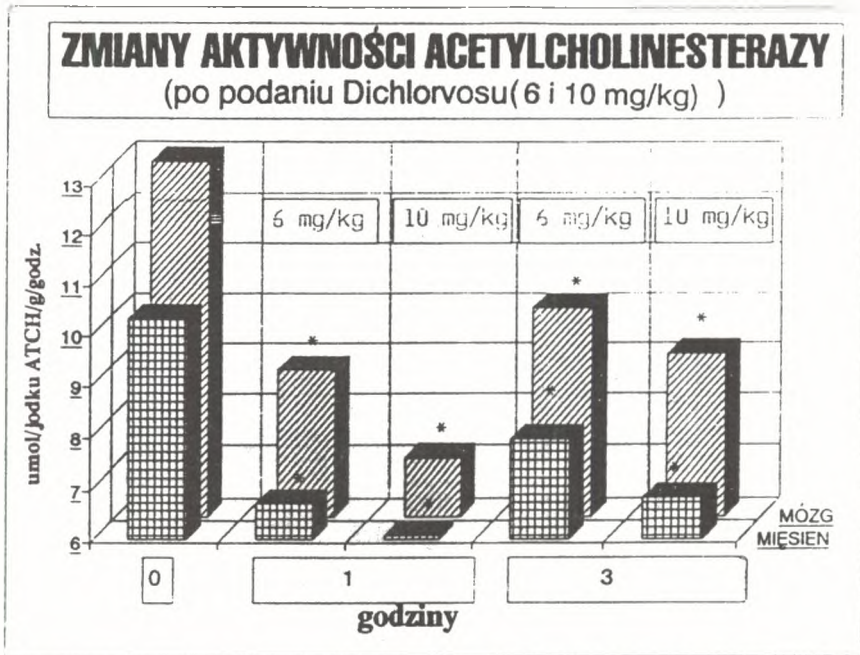
Tab. 2. Zmiany zawartości zredukowanego glutationu (GSH) w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach po 1 i 3 godzinach od iniekcji dichlorvosu w jednorazowych dawkach 6 i 10 mg/kg

Badany narząd	Dawka	Czas po podaniu dichlorvosu (godz.)		
		0	1	3
KREW	6	1,00 ± 0,19 (100)	1,33 ± 0,20* (133)	0,86 ± 0,19 (86)
	10	1,00 ± 0,19 (100)	1,14 ± 0,17 (114)	0,71 ± 0,16* (71)
MÓZG	6	0,84 ± 0,11 (100)	1,12 ± 0,19* (133)	1,23 ± 0,18* (146)
	10	0,84 ± 0,11 (100)	1,38 ± 0,22* (164)	1,48 ± 0,25* (176)
WĄTROBA	6	2,35 ± 0,29 (100)	2,96 ± 0,35* (126)	2,77 ± 0,36* (118)
	10	2,35 ± 0,29 (100)	3,67 ± 0,68* (156)	3,81 ± 0,44* (162)
NERKI	6	1,90 ± 0,23 (100)	1,32 ± 0,22* (69)	1,83 ± 0,21 (96)
	10	1,90 ± 0,23 (100)	1,08 ± 0,11* (57)	1,24 ± 0,20* (65)

Wartość $x \pm SE$ z 10 osobników, wartości w nawiasach wskazują na procentowe zmiany badanego parametru w stosunku do wartości kontrolnych (100%).

*Statystycznie istotne przy $p \leq 0,01$

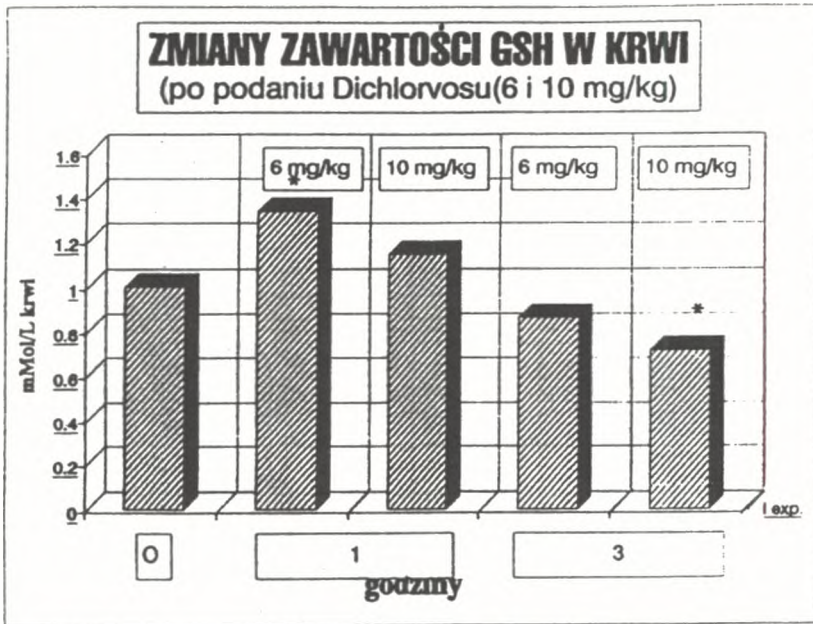
Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że jednorazowe podanie dichlorvosu wywołuje matematycznie potwierdzone zmiany badanych wskaźników. Dichlorvos w zastosowanych dawkach i w wybranych przedziałach czasowych powoduje hamowanie aktywności AchE zarówno w mózgu, jak i mięśniu. Obraz stwierdzonych zmian był zasadniczo podobny. Maksimum zmian zanotowano zarówno w mózgu, jak i mięśniu po 1 godzinie od podania dichlorvosu w dawce 10 mg/kg masy ciała. Zmiany stężenia GSH w krwi samców myszy wykazywały pewną fazowość zmian. Obserwowano niewielki wzrost (po 1 godz.), a następnie obniżenie stężenia tego trójpeptydu. Zawartość GSH w mózgu po podaniu dichlorvosu zarówno w dawce 6, jak i 10 mg/kg masy



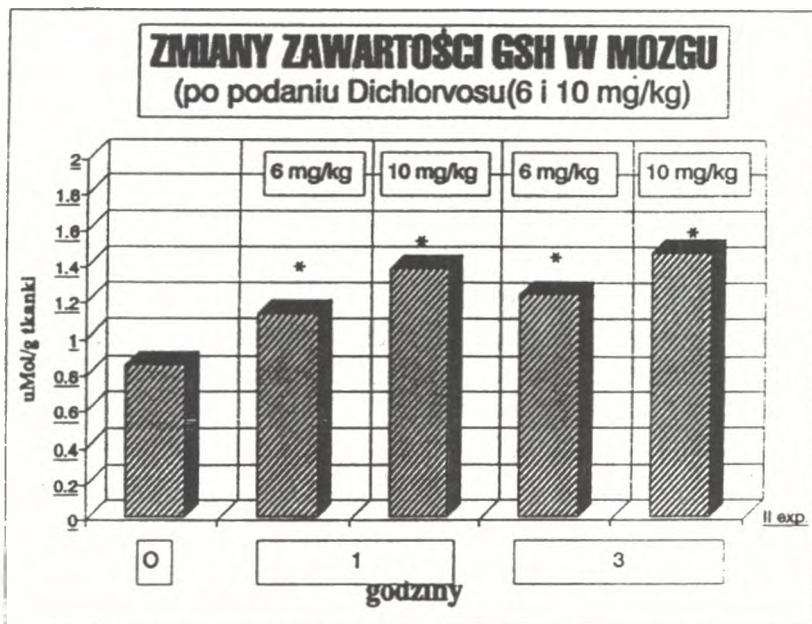
Ryc. 1. Aktywność acetylocholinesterazy (μM jodku ATCh/g/min) w mózgu i mięśni szkieletowym po 1 i 3 godzinach od momentu podania dichlorvosu wyrażona w jednostkach aktywności w stosunku do wartości kontrolnych.

Statystycznie istotne różnice* pomiędzy wartościami kontrolnymi, a wartościami zwierząt eksponowanych na dichlorvos w różnych przedziałach czasu ($p \leq 0,05$)

ciała pozostawała powyżej wartości kontrolnych w dwu analizowanych przedziałach czasowych. Stężenie zredukowanego glutationu w wątrobie w analizowanych przedziałach czasowych wykazywało potwierdzony statystycznie wzrost. Zanotowano wyraźną zależność zmian stężenia GSH od zastosowanej dawki. Obraz zmian stężenia GSH w nerkach był zasadniczo odmienny. Zaobserwowano generalnie statystycznie istotny spadek zawartości tego trójpeptydu w nerkach. Stężenie GSH w nerkach po 3 godzinach od czasu podania insektycydu w dawce 6 mg/kg pozostawało zasadniczo na poziomie zbliżonym do wartości kontrolnych.

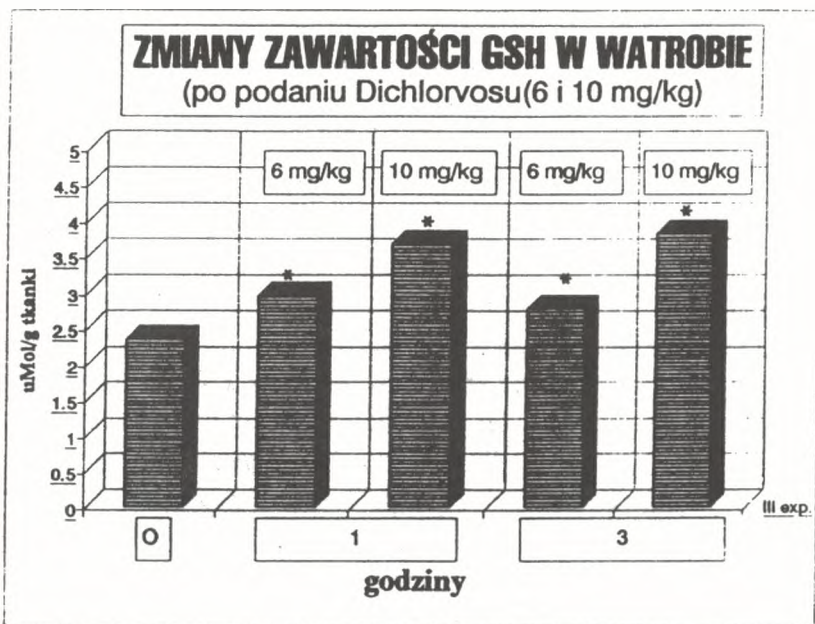


Ryc. 2. Zmiany zawartości zredukowanego glutationu w krwi po 1 i 3 godzinach od momentu podania dichlorvosu.

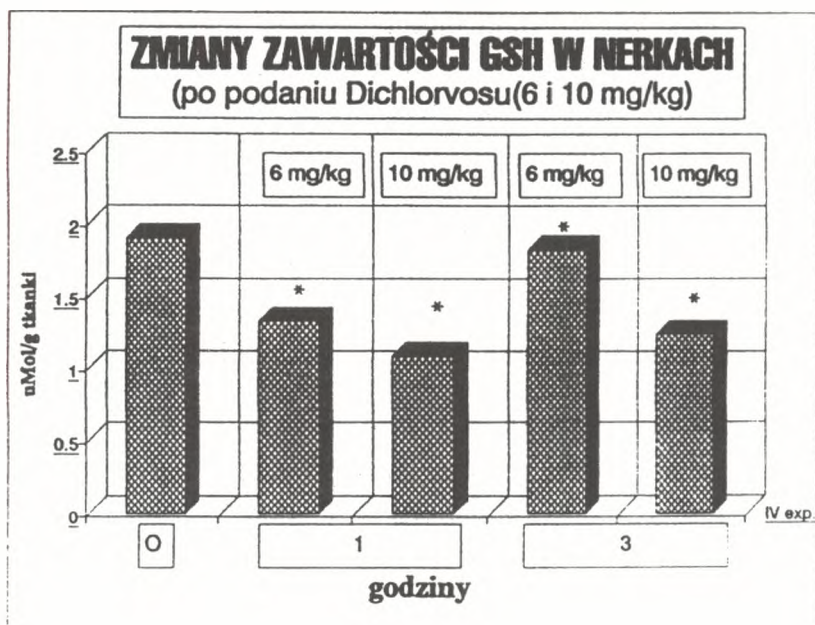


Ryc. 3. Zmiany zawartości zredukowanego glutationu w mózgu po 1 i 3 godzinach od momentu podania dichlorvosu.

*Statystycznie istotne przy $p \leq 0,01$



Ryc. 4. Zmiany zawartości zredukowanego glutationu w wątrobie po 1 i 3 godzinach od momentu podania dichlorvosu.



Ryc. 5. Zmiany zawartości zredukowanego glutationu w nerkach po 1 i 3 godzinach od momentu podania dichlorvosu.

*Statystycznie istotne przy $p \leq 0,01$

Dyskusja

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że insektycyd fosforoorganiczny dichlorvos powoduje zależne od dawki i czasu ekspozycji hamowanie acetylocholinesterazy w mózgu i mięśni. Dichlorvos zarówno w dawce 6 mg/kg, jak i 10 mg/kg powodował istotne matematycznie hamowanie AchE. Obserwowane zmiany w obu badanych tkankach były zaznaczone najwyraźniej po 1 godzinie od czasu ekspozycji. Obraz zmian zawartości GSH w krwi, mózgu wątrobie i nerkach po podaniu dichlorvosu był zróżnicowany. Zanotowane zmiany w wątrobie i mózgu miały podobny przebieg. W obu analizowanych tkankach maksymalny wzrost zawartości GSH zanotowano w przypadku dawki 10 mg/kg. W krwi natomiast obserwowano początkowo (po 1 godz.) wzrost w zawartości tego trójpeptydu, a następnie (po 3 godz.) spadek stężenia GSH. W nerkach zaś wykazano w początkowej fazie wyraźnie zaznaczony spadek stężenia zredukowanego glutationu. Po 3 godzinach obserwowane zmiany były mniej zaznaczone. Uzyskane dane liczbowe i zaobserwowana tendencja zmian aktywności AchE są w dużym stopniu zbieżne z badaniami Gupta i Dettbarn (1987) dotyczącymi wpływu insektycydów fosforoorganicznych na zmiany aktywności AchE i metabolizmu energetycznego tkanki mózgowej i mięśniowej. Zanotowana kinetyka zmian aktywności AchE jest specyficzna dla działania insektycydów fosforoorganicznych (Takahashi i inni 1991); Reddy i Rao 1991). Przyczyną zaobserwowanych zmian jest zdolność dichlorvosu do fosforylacji ośrodka aktywnego AchE i nieodwracalne hamowanie aktywności enzymu. Konsekwencją fizjologiczną tych zmian jest akumulacja acetylocholiny w miejscach cholinoceptywnych i przedłużona stymulacja cholinergiczna, doprowadzająca do bloku depolaryzacyjnego zarówno w synapsach cholinergicznym, jak i płytkach nerwowo-mięśniowych. Dichlorvos wywołuje też zmiany niespecyficzne w narządach obwodowych będące, jak się wydaje, w pewnej zależności od zmian specyficznych. Z badań Reddy i Rao (1991); Dagaev i inni (1991) wynika, że intoksykacja dichlorvosem powoduje interferencję z innymi niż AchE układami enzymatycznymi, takimi jak dehydrogenaza bursztynianowa, dehydrogenaza izocytrynianowa, dehydrogenaza mleczanowa, dehydrogenaza pirogronianowa. Do niespecyficznych zmian, jak można sądzić, należy zaliczyć zanotowane w niniejszych badaniach zmiany

w zawartości GSH w mózgu, krwi, wątrobie i nerkach. Zmiany stężenia tego trójpeptydu w wątrobie i mózgu były w pewnym zakresie równoległe do zmian aktywności AchE mózgu i mięśniu. Zredukowany glutation jest trójpeptydem (γ -glutamyl-cysteinyl-glicyna) obecnym w przestrzeni wewnątrzkomórkowej wielu tkanek oraz w płynach zewnątrzkomórkowych (Meister 1974). U szczurów fizjologiczna koncentracja GSH w osoczu wynosi ok. $10 \mu\text{M}$ (głównie jako zredukowany glutation). Stężenie jednak GSH jest różne w krwi różnych naczyń krwionośnych. W *v. hepatica* jest ono wyraźnie wyższe niż w *v. renalis*. Nerki są miejscem ekskrecji GSH, natomiast wątroba miejscem jego syntezy. Obserwowany w niniejszych badaniach wzrost stężenia GSH w mózgu, wątrobie i krwi oraz spadek zawartości GSH w nerkach jest, być może, związany z indukcją syntezy *de novo* lub/i obniżeniem przemiany GSH w tkankach peryferycznych, istotnych z toksykologicznego punktu widzenia dla działania dichlorvosu. Z badań Tate (1980) wynika, że przemiany zredukowanego glutationu tj. nieenzymatyczne przeniesienie wodoru z GSH na cysteinylbisglicynę w wątrobie i nerkach, w odróżnieniu od krwi zachodzi w niewielkim stopniu. Z badań O'Leary i Tracy (1991) wynika także możliwość bezpośredniej interferencji dichlorvosu z układem GSH/GSSG, ponieważ O-demetylacja dichlorvosu jest zależna od glutationu poprzez glutationową S-transferazę. Niniejsze rozważania wymagają potwierdzenia tego w dalszych badaniach i szerszej analizy statystycznej.

Literatura

- Dagaev V.N., Iskandarov A.I., Samibaev K.M., Strokova V.A., Zimina L.M. 1991, *The clinico-morphological toxicodynamics of organophosphate insecticide poisonings*. Sud-Med-Ekspert. 34(2): 34–37
- Ellman G.L., 1959, *Tissue sulfhydryl groups*. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77
- Ellman G.L., Gourtney K.D., Andres V., and Fretherstorn R.M., 1961, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95
- Gupta R.C., and Dettbarn W.D., 1987, *Alterations of high-energy phosphate compounds in the skeletal muscles of rats intoxicated with dissoporypylophosphorofluoridate and soman*. Fund. Appl. Toxicol. 8, 400–407
- Gupta P. K., and Salunkhe D.K., 1985, *Basis of organ reproduction toxicity*, In: *Modern Toxicology*. Metropolitan-India

- Meister A., 1974, New aspects of glutathione biochemistry and transport selective alteration of glutathione metabolism. *Federation proceedings* 43, 3031–3042
- Mikstacka R., 1988, Rola transferaz glutationowych w inaktywacji związków kancerogennych. *Post. Biochem.* 34, 47–57
- O'Leary K.A., and Tracy J.W., 1991, *Schistosoma mansoni*: glutathione S-transferase-catalyzed detoxication of dichlorvos. *Exp. Parasitol.* 74, (2), 355–361
- Reddy M.S., and Rao K.V., 1991, Phosphamidon, methylparathion, and dichlorvos impact on tissue oxidative metabolism in penaeid prawn. *Metapenaeus monoceros*. *Biochem. Int.* 23 (3), 439–447
- Takahashi H., Kojima T., Ikeda T., Tsuda S., Shirasu Y., 1991, Differences in the mode of lethality produced through intravenous and oral administration of organophosphorus insecticides in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 16 (3), 459–468
- Tate S.S., 1980, Enzymatic basis of detoxication (Jakoby W.B., ed.) 2,15. Academic Press, New York
- Wilson B.W., Ishikawa Y., Chow E., and Sisson M., 1983, Multilevel studies on organophosphate toxicity. *Neurotoxicol.* 4, 143

Bogdan Koczanowski

The Changes of Acetylcholinesterase (AChE) Activity and Glutathione Concentrations in Selected Organs Mice after Dichlorvos Exposure

Summary

The study was carried out on 4 month old mature male white mice received intraperitoneale single doses of dichlorvos (6 mg/kg and 10 mg/kg). There was determined the activity of acetylcholinesterase in the brain and the muscle homogenates (musculus quadriceps femoris). There were determined the levels of glutathione in the blood serum, liver, brain and kidneys'.

The statistic analysis of obtained results proved that both, single doses of dichlorvos caused different reactions in male mice. Changes of activity acetylcholinesterase and concentration glutathione in examined tissues were dose dependent. Percent of inhibition AChE-activity after 1 hour of intoxication was the highest. In the case of GSH maximal effect was found after 3 hours of intoxication.