

Bogdan Koczanowski\*

## Zmiany aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) oraz zawartości zredukowanego glutationu (GSH) po obciążeniu zwierząt różnymi neurotoksynami z grupy pestycydów

### Streszczenie

Przebadano wpływ 3 różnych chemicznie i o wysokim stopniu czystości pestycydów na aktywność AChE w mózgu i mięśniu (*musculus quadriceps femoris*) oraz zawartość GSH w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi. Badania przeprowadzono na dorosłych samcach myszy białej, którym w dawkach jednorazowych *per os* podawano dichlorvos, malation (insektycydy) i chlormequat (herbicyd). W mózgu i mięśniu oznaczano aktywność AChE metodą Ellmana (1961), natomiast w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi zawartość zredukowanego glutationu metodą Ellmana (1959). Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że procent hamowania AChE zarówno w mózgu, jak i mięśniu po podaniu dichlorvosu był najwyższy, natomiast po podaniu chlormequatu najniższy. Obraz zmian zawartości GSH w badanych tkankach po podaniu pestycydów był odmienny. Podanie chlormequatu wywołało największe zmiany badanego parametru po 3 godzinach od podania pestycydu. Obraz zanotowanych zmian po podaniu dichlorvosu i malationu był zasadniczo równoległy do zmian obserwowanych po podaniu chlormequatu. Zanotowane zmiany po podaniu 3 różnych pestycydów są jednak wysoce zróżnicowane i wymagają dalszej weryfikacji eksperymentalnej.

---

\* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii WSP w Krakowie.

## Wstęp

Acetylocholinoesteraza (AChE) odgrywa istotną rolę w rozkładaniu acetylocholiny w szczelinie synaptycznej synaps cholinergicznycch. Inhibitory tego enzymu, takie jak związki fosforoorganiczne (FO) istotnie modyfikują transmisję nerwową połączeń neuro-neuronalnych i nerwowo-mięśniowych wywołując wzmożone drganie pęczkowe mięśni, osłabienie mięśniowe i w konsekwencji nekrozę mięśni (Laskowski i Dettbarn 1979). Przedłużone podawanie związków FO o działaniu antycholinesterazowym (anty ChE) początkowo nie wywołuje opisanych symptomów zatrucia, ale prowadzi do stopniowej adaptacji wyrażającej się obniżeniem intensywności drżenia pęczkowego i ogólną tolerancją behawioralną (Costa i wsp. 1982).

Różne cholinergiczne mechanizmy biochemiczne odpowiedzialne są za zjawiska adaptacji ogólnofizjologicznej i behawioralnej włączając: (a) zmniejszenie cholinergicznycch miejsc wiążących dla receptorów muskarynowycch i nikotynowycch (Gupta i wsp. 1985b); (b) obniżenie wychwytu radioaktywnej choliny (Yamada i wsp. 1983); (c) stymulacja syntezy AChE (Gupta i wsp. 1985a). Dodatkowymi mechanizmami ogólnej tolerancji na związki FO wydaje się być zdolność związków antyChE do wiązania innych aktywnycch miejsc w enzymach zawierających serynę, np. w aliesterazach i cholinesterazach. Jednak funkcjonalna rola tych enzymów nie jest znana. Można jednak przypuszczać, że wiązanie związków antyChE i hamowanie tych enzymów obniża stężenie wolnego inhibitora zdolnego do reagowania z AChE. Potwierdzeniem tej sugestji są badania Clementa (1984), w których autor wykazał potencjalizację działania związków FO po zablokowaniu aliesteraz. Niewiele jest danych literaturowycch dotyczących antyCh działania herbicydu z grupy dwupirydyli – chlormequatu. Wiadomo jednak, że symptomy zatrucia tym związkiem są analogiczne jak w przypadku intoksykacji związkami FO.

Obok wielu związków o działaniu protekcyjnym ( $\alpha$ -tocopherol, kwas askorbinowy) zredukowany glutation (GSH) jest proponowany (Lash i wsp. 1986) jako potencjalnie efektywny związek terapeutyczny.

Systemy metabolizujące leki oraz systemy redox w tkankach docelowycch dla działania związków antyChE są pierwszą linią obronną po ekspozycji na różne ksenobiotyki w tym i pestycydy. Glutation spełnia istotną rolę protekcyjną dla uszkodzeń chemicznycch funkcjonując jako substrat dla glutationowycch transferaz (RX: glutationowa R-transferaza EC 2.5.1.18) i glutationowej peroksydazy (glutation: nadtlenek wodoru oksydoreduktaza

EC 1.11.1.9). Glutationowe transferazy katalizują reakcję GSH ze związkami elektrofilnymi do form nietoksycznych koniugantów, natomiast peroksydaza glutationowa zużywa GSH jako czynnika redukującego, obniżającego toksyczność nadtlenków (Jones i wsp. 1981).

## Material i metodyka badań

Badania przeprowadzono na 90 dojrzałych płciowo samcach myszy białej o masie 23–26g. Wszystkie zwierzęta użyte do badań utrzymywane były w jednakowych warunkach oświetlenia (LD 12:12) w pomieszczeniu przewietrzanym o temp.  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Zwierzęta żywiono pełnowartościowym pokarmem standardowym *ad libitum*. Eksperyment przeprowadzono w etapach obrazujących wpływ trzech różnych pod względem charakterystyki chemicznej i toksykologicznej pestycydów na aktywność AChE w mózgu i mięśni (*musculus quadriceps femoris*) oraz zawartość GSH w homogenatach wątroby, nerek, mózgu i w krwi. Osobniki użyte do badań podzielono na grupy kontrolne i doświadczalne liczące po 10 samców.

W pierwszej fazie eksperymentu wykonywano badania dotyczące wpływu jednorazowych dawek insektycydu fosforoorganicznego dichlorvosu na aktywność GSH w wybranych narządach. Osobniki otrzymujące *per os* dichlorvos (2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate) w dawce 6 mg/kg, podzielono na jedną grupę kontrolną i dwie doświadczalne.

Druga faza badań dotyczyła wpływu jednorazowych dawek insektycydu fosforoorganicznego malationu na poziom analogicznych jak w przypadku dichlorvosu wskaźników biochemicznych. Samce eksponowane *per os* na malation [S-1,2-bis-(ethoxycarbonyl) ethyl 0,0-dimethyl phosphorodithioate] w dawce 350 mg/kg masy ciała podzielono również na jedną grupę kontrolną i dwie grupy doświadczalne.

Trzecia faza badań dotyczyła wpływu jednorazowych dawek herbicydu chlormequat (2-chloroethyltrimethylammonium chloride) na analogiczne wskaźniki biochemiczne.

Zwierzęta jednorazowo eksponowane na chlormequat w dawce 600 mg/kg masy ciała podzielono na grupę kontrolną i dwie grupy doświadczalne.

Zwierzęta kontrolne oraz otrzymujące *per os* dichlorvos, malation i chlormequat zabijano przez dekapitację po 1 i 3 godzinach od momentu podania pestycydów. Samce myszy użyte do doświadczeń zabijano zawsze o godz.

10 w celu zniwelowania wahań rytmiki okołodobowej w poziomie hormonów, enzymów i metabolitów.

W pobranych od zwierząt tkankach oznaczano aktywność AChE metodą Ellmana (1961). Wyniki podano w  $\mu\text{M}/\text{jodku ATCh}/\text{g}/\text{h}$ . Wypreparowane narządy – wątrobę, nerki i mózg po perfuzji roztworem soli fizjologicznej homogenizowano w schłodzonym 0,1 M buforze fosforanowym o pH w homogenizatorze teflonowym. Homogenat wirowano przez 15 min. przy 15 tys. obr/min. W supernatantach oraz w krwi oznaczono zawartość GSH metodą Ellmana (1959). Zawartość GSH wyliczono w tkankach w  $\mu\text{M}/\text{g}$  tkanki, natomiast we krwi w  $\text{mM}/\text{L}$ .

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie. Obliczono wartości średnie, odchylenie standardowe, a także zmiany procentowe badanych parametrów, przyjmując  $\bar{x}$  za 100%. Do analizy statystycznej zastosowano test "t".

## Wyniki

Dane liczbowe dotyczące wpływu jednorazowych dawek insektycydów fosforoorganicznych dichlorvosu i malationu oraz herbicydu chlormequatu na zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśniu oraz zawartości GSH w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi zestawiono w tabelach 1–6 oraz zilustrowano graficznie na ryc. 1–6.

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że jednorazowe podanie dichlorvosu (*per os*) w zastosowanej dawce (6 mg/ kg masy ciała) wywołuje potwierdzone matematycznie zmiany badanych parametrów. Dichlorvos w zastosowanej dawce i w badanych przedziałach czasowych powoduje hamowanie aktywności AChE zarówno w mózgu, jak i w mięśniu. Zakres zanotowanych zmian był zarówno w mózgu, jak i w mięśniu podobny. Maksymalne zmiany zanotowano zarówno w mózgu, jak i w mięśniu po 1 godz. od podania insektycydu. Obraz zanotowanych zmian w obu badanych przedziałach czasowych wyrażający się wzrostem zawartości GSH w mózgu i wątrobie był zasadniczo równoległy. Podobnie równoległy charakter zmian zanotowano w obu przedziałach czasowych dla nerek, ale o kierunku przeciwnym (spadek zawartości GSH). Zmiany stężenia GSH w krwi samców myszy charakteryzowała pewna fazowość. Po jednej godzinie od podania dichlorvosu zanotowano potwierdzony statystycznie wzrost zawartości GSH, a następnie spadek stężenia.

Zanotowane zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśni po podaniu malationu miały podobny zakres i kierunek mierzony spadkiem aktywności badanego enzymu. Obraz i kierunek zmian zawartości GSH po jednorazowym podaniu malationu w zastosowanej dawce i w wybranych przedziałach czasu był w przypadku wątroby, mózgu i nerek zasadniczo podobny do zmian zanotowanych po podaniu dichlorvosu. Natężenie tych zmian mierzone w wartościach procentowych było jednak słabiej zaznaczone niż w przypadku dichlorvosu. Zmiany stężenia GSH w krwi myszy również charakteryzowała pewna fazowość, podobnie jak w przypadku dichlorvosu, wyrażona wzrostem zawartości tego trójpeptydu po 1 godzinie, a następnie nieznacznym spadkiem stężenia po 3 godzinach. Odmiennie jednak od zmian zanotowanych w przypadku dichlorvosu, wartości stężenia GSH w krwi po podaniu malationu utrzymywały się powyżej wartości kontrolnych.

Zmiany aktywności AChE po podaniu chlormequatu w zastosowanej dawce i w badanych dwóch przedziałach czasowych były generalnie znacznie słabiej zaznaczone. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian aktywności badanego enzymu w mięśni po 1 godz. od podania tego insektycydu. W pozostałych przypadkach zanotowano istotne matematycznie obniżenie aktywności AChE. Zmiany stężenia zredukowanego glutationu po podaniu chlormequatu miały odmienny obraz niż w przypadku dichlorvosu i malationu. Po jednej godzinie od podania (*per os*) chlormequatu wykazano wzrost zawartości tego trójpeptydu we wszystkich badanych tkankach, jednak potwierdzony statystycznie tylko w przypadku wątroby i krwi. Po 3 godzinach od podania herbicydu zmiany badanego wskaźnika były wyraźnie zaznaczone i wynosiły dla wątroby – 186,8% poziomu kontroli (p.k), krwi – 181,3% p.k., nerek – 140% p.k. oraz dla mózgu – 118,4 % p.k. Zanotowane zmiany dla tego przedziału czasowego były we wszystkich tkankach istotne statystycznie.

**Tab. 1. Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśni  
po jednorazowej ekspozycji na dichlorvos (6 mg/kg masy ciała)**

Aktywność AChE	Czas po podaniu dichlorvosu (godz.)		
	0	1	3
<b>Mózg</b>	12.97 ± 1.83 (100)	8.84 ± 1.67* (68.1)	10.07 ± 1.28* (77.6)
<b>Mięsień</b>	10.29 ± 1.53 (100)	6.69 ± 0.79* (65)	7.91 ± 1.05* (76.8)

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

\* Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami u zwierząt kontrolnych i wartościami u zwierząt ekspozowanymi na dichlorvos w różnych przedziałach czasu ( $p \leq 0.05$ ).

**Tab. 2. Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśni  
po jednorazowej ekspozycji na malation (350 mg/kg masy ciała)**

Aktywność AChE	Czas po podaniu malationu (godz.)		
	0	1	3
<b>Mózg</b>	13.42 ± 1.69 (100)	10.11 ± 1.24* (75.3)	11.33 ± 1.16* (84.4)
<b>Mięsień</b>	11.34 ± 1.47 (100)	8.42 ± 0.96* (74.2)	9.27 ± 0.98* (81.7)

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

\* Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami u zwierząt kontrolnych i wartościami u zwierząt ekspozowanymi na malation w różnych przedziałach czasu ( $p \leq 0.05$ ).



**Tab. 3.** Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśni  
po jednorazowej ekspozycji na chlormequat (600 mg/kg masy ciała)

Aktywność AChE	Czas po podaniu chlormequatu (godz.)		
	0	1	3
<b>Mózg</b>	13.96 ± 1.44 (100)	12.16 ± 1.21* (87.1)	10.12 ± 1.04* (72.5)
<b>Mięsień</b>	12.64 ± 1.28 (100)	12.68 ± 1.43 (100.3)	9.76 ± 0.87* (77.2)

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

\* Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami u zwierząt kontrolnych i wartościami u zwierząt eksponowanych na chlormequat w różnych przedziałach czasu ( $p \leq 0.05$ ).

**Tab. 4.** Zmiany zawartości zredukowanego glutationu (GSH) w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi po 1 i 3 godzinach od podania dichlorvosu w jednorazowej dawce (*per os*) 6 mg/kg

Badany narząd	Czas po podaniu dichlorvosu (godz.)		
	0	1	3
<b>Wątroba</b>	2.27 ± 0.29 (100)	3.6 ± 0.35* (158.5)	3.8 ± 0.36* (167.4)
<b>Nerki</b>	1.84 ± 0.22 (100)	1.14 ± 0.20* (61.9)	1.26 ± 0.21* (68.5)
<b>Mózg</b>	0.88 ± 0.11 (100)	1.34 ± 0.19* (152.3)	1.48 ± 0.18* (168.2)
<b>Krew</b>	0.97 ± 0.19 (100)	1.16 ± 0.21* (119.6)	0.58 ± 0.14* (59.7)

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

\* Statystycznie istotne przy ( $p \leq 0.05$ ).

**Tab. 5.** Zmiany zawartości zredukowanego glutationu (GSH) w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi po 1 i 3 godzinach od podania malationu w jednorazowej dawce (*per os*) 350 mg/kg

Badany narząd	Czas po podaniu malationu (godz.)		
	0	1	3
<b>Wątroba</b>	2.16 ± 0.25 (100)	3.21 ± 0.27* (148.6)	3.26 ± 0.27* (150.9)
<b>Nerki</b>	1.64 ± 0.17 (100)	1.54 ± 0.14 (93.9)	1.26 ± 0.14* (76.8)
<b>Mózg</b>	0.67 ± 0.09 (100)	0.94 ± 0.11* (140.2)	0.87 ± 0.08* (129.8)
<b>Krew</b>	0.84 ± 0.12 (100)	1.74 ± 0.19 * (207.1)	1.26 ± 0.14* (150)

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

\* Statystycznie istotne przy ( $p \leq 0.05$ ).

**Tab. 6.** Zmiany zawartości zredukowanego glutationu (GSH) w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi po 1 i 3 godzinach od podania chlomequatu w jednorazowej dawce (*per os*) 600 mg/kg

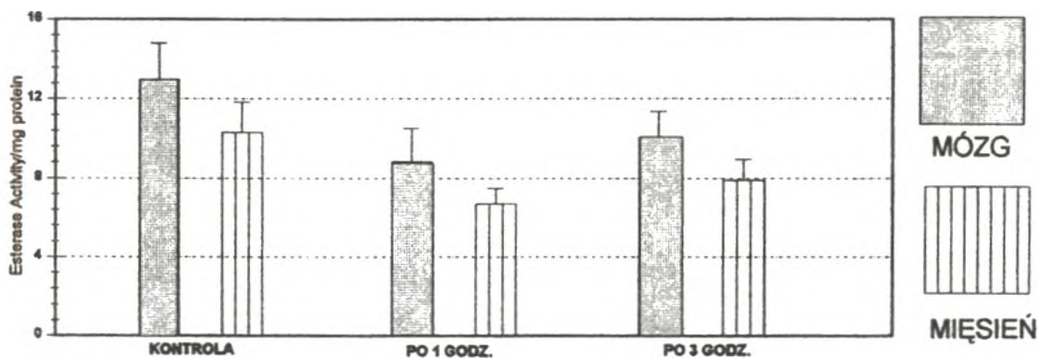
Badany narząd	Czas po podaniu chlomequatu (godz.)		
	0	1	3
<b>Wątroba</b>	2.13 ± 0.23 (100)	2.71 ± 0.29* (127.2)	3.98 ± 0.40* (186.8)
<b>Nerki</b>	1.49 ± 0.16 (100)	1.58 ± 0.20 (106)	2.09 ± 0.23* (140.3)
<b>Mózg</b>	0.98 ± 0.09 (100)	1.02 ± 0.12 (104.1)	1.16 ± 0.14* (118.36)
<b>Krew</b>	1.07 ± 0.09 (100)	1.28 ± 0.14* (119.6)	1.94 ± 0.19* (181.3)

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

\* Statystycznie istotne przy ( $p \leq 0.05$ ).

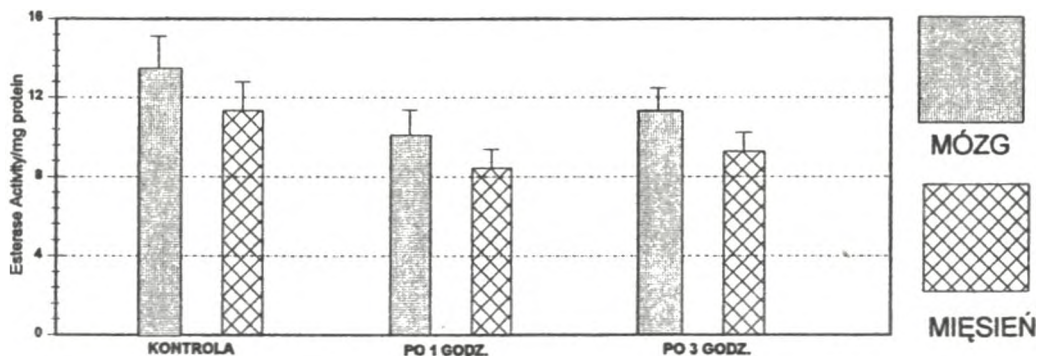


## Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśniu po podaniu dichlorvosu



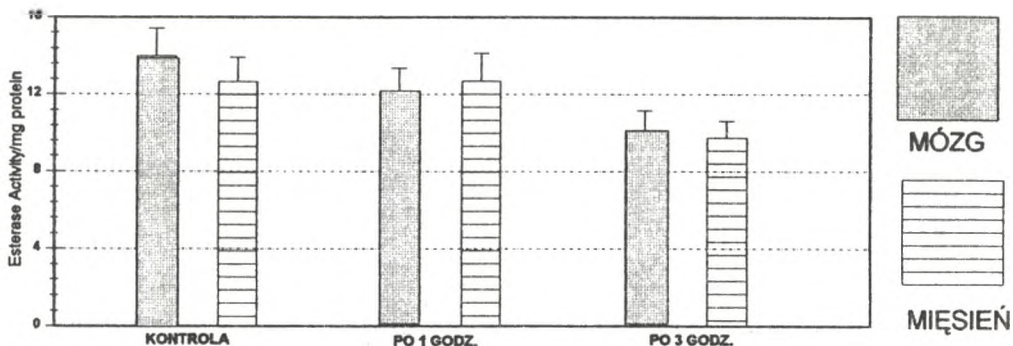
Ryc. 1. Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśniu po podaniu dichlorvosu w dawce 6mg/kg masy ciała

## Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśniu po podaniu malationu



Ryc. 2. Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśniu po podaniu malationu w dawce 350 mg/kg masy ciała

### Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśniu po podaniu chlormequatu



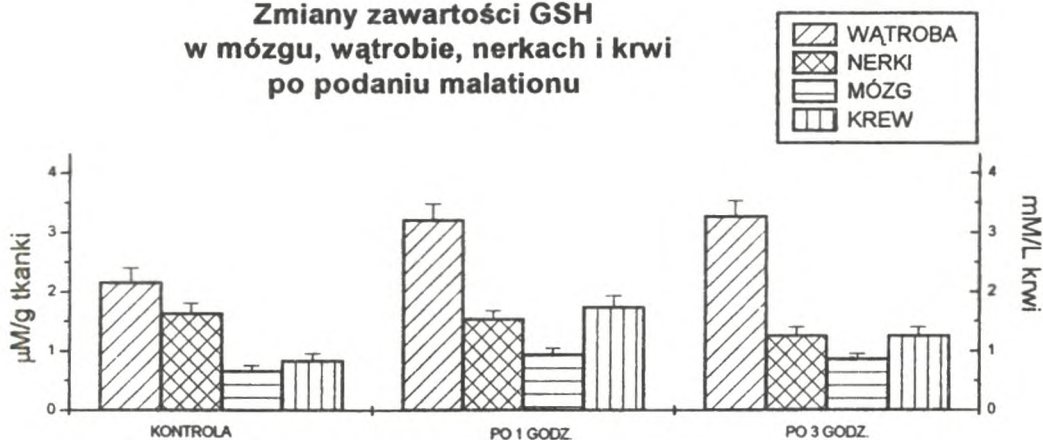
Ryc. 3. Zmiany aktywności AChE w mózgu i mięśniu po podaniu chlormequatu w dawce 600mg/kg masy ciała

### Zmiany zawartości GSH w wątrobie, nerkach i mózgu po podaniu dichlorvosu



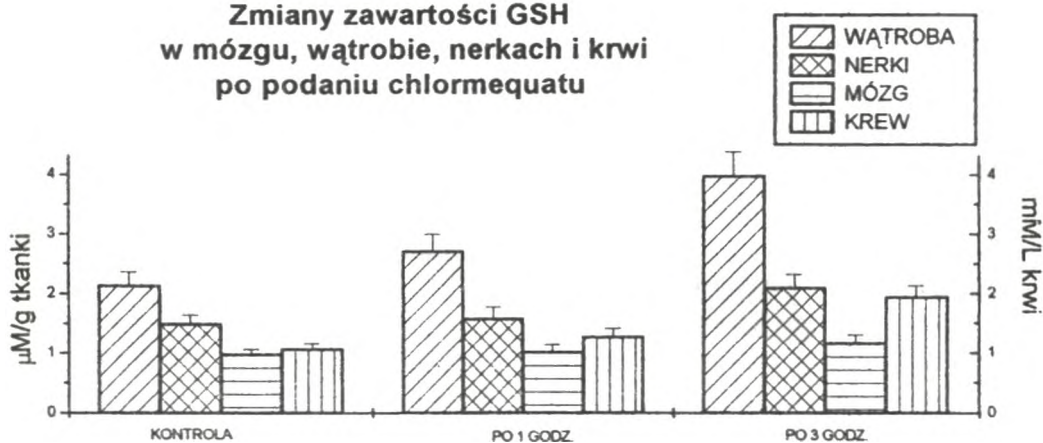
Ryc. 4. Zmiany zawartości GSH w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi po podaniu dichlorvosu w dawce 6mg/kg masy ciała

**Zmiany zawartości GSH  
w mózgu, wątrobie, nerkach i krwi  
po podaniu malionu**



**Ryc. 5.** Zmiany zawartości GSH w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi po podaniu malionu dawce 350 mg/kg masy ciała

**Zmiany zawartości GSH  
w mózgu, wątrobie, nerkach i krwi  
po podaniu chlomequatu**



**Ryc. 6.** Zmiany zawartości GSH w wątrobie, nerkach, mózgu i krwi po podaniu chlomequatu w dawce 600 mg/kg masy ciała

## Dyskusja

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że insektycydy fosforoorganiczne dichlorvos i malation, a także herbicyd chlormequat w zastosowanych dawkach oraz w badanych przedziałach czasowych wywołały w mózgu i mięśni hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy. Efekt antycholinesterazowy działania insektycydów był najwyraźniej zaznaczony po 1 godzinie od czasu podania związków, natomiast w przypadku herbicydu po 3 godzinach. Antycholinesterazowe działanie insektycydów fosforoorganicznych w tym dichlorvosu i malationu jest dobrze udokumentowane (Cohen i wsp. 1985; Kobayashi i wsp. 1986). W przypadku chlormequatu dane literaturowe są nieliczne. Gupta i Salunkhe (1985) podają, że chlormequat obniża aktywność AChE. Analiza struktury chemicznej badanych związków pozwala jednak przypuszczać, że u podstaw hamowania aktywności AChE w przypadku insektycydów i herbicydu leżą różne mechanizmy antycholinesterazowe.

Z analizy profili hamowania AChE (ryc.1 i 2) dla dichlorvosu i malationu w mózgu i mięśni wynika pewne podobieństwo przebiegu krzywych w zależności od czasu ekspozycji. Uzyskane dane liczbowe są generalnie zgodne z wynikami otrzymanymi dla mózgu i różnych mięśni przez Gupta i wsp. (1987), ale z zastosowaniem innych inhibitorów fosforoorganicznych. Na podstawie danych literaturowych można sądzić o dość wyraźnym zróżnicowaniu aktywności AChE w różnych regionach mózgu po ekspozycji na związki fosforoorganiczne skorelowane jednocześnie ze zmianami behawioralnymi. Gupta i wsp. (1987) sugerują także specyficzną rolę molekularnej 16 S formy AChE w mięśniach w interakcji z insektycydami fosforoorganicznymi. Autorzy sądzą, że hamowanie formy 16 S (kojarzonej z regionem płytki końcowej) jest mechanizmem włączającym nekrozę mięśni. Z uzyskanych danych liczbowych przez autorów wynika, co wydaje się szczególnie interesującym, obserwowane po ekspozycji na związki fosforoorganiczne całkowite zahamowanie aktywności karboksylesterazy [EC 3.1.1.1.] w osoczu przy równoczesnym braku inhibicji enzymu w wątrobie.

Badania nad zmianami tempa procesów biochemicznych sugerują, że grupy tiolowe, zwłaszcza niebiałkowe grupy sulfhydrylowe mogą być wykorzystywane jako dane obrazujące kierunek i natężenie niektórych zmian biochemicznych w organizmie (Meister 1973, 1974; Kołataj 1986). Poziom glutationu w osoczu krwi jest o wiele niższy (15–35  $\mu\text{M}$  u myszy i u szczura) niż znajdujący w innych tkankach (0,5–10 mM). Dane te mogą wskazy-

wać, że glutation w osoczu ulega szybkiemu obrotowi, tym bardziej, że tempo syntezy wynosi 1 min. (Meister 1974). Szybki przepływ glutationu z tkanek do osocza limitowany jest wysoką aktywnością transpeptydazy tkankowej. Głównymi narządami biorącymi udział w międzynarządowym krążeniu glutationu są wątroba i nerki o szczególnie wysokiej aktywności transpeptydazy. Z badań Tate (1980) wynika, że koncentracja GSH w wątrobie wykazuje pewną stabilność, która może wynikać z faktu obecności dwóch różnych w sensie metabolicznym pul GSH; puli stabilnej i puli labilnej. Stosunkowo jednak niewielka liczba publikacji traktuje o poziomie niebiałkowych grup SH u zwierząt laboratoryjnych eksponowanych na podawane egzogennie pestycydy.

Z uwagi na fakt, że badane narządy różnią się znacznie strukturą morfologiczną jak i profilem biochemicznym można było przypuszczać co do różnic w zawartości grup SH po ekspozycji na zastosowane pestycydy. Wykazano, że najwyższą koncentracją wolnych tioli spośród badanych narządów charakteryzowała się wątroba, najniższą nerki i mózg. Zdanych literaturowych wynika, że GSH zarówno w mózgu (Lach i wsp.), jak i w nerce (Meister) zużywany jest bardzo intensywnie. Stężenie GSH a tym samym stosunek GSH/GSSG jest limitowane wysoką aktywnością reduktazy glutationowej wymagającej do katalizy zredukowanych nukleotydów. Poziom ten zależny jest także od procesów biotransformacyjnych (II faza) zarówno substancji endo- jak i egzogennych. Inicjującym etapem sprzęgania z glutationem jest reakcja enzymatyczna katalizowana przez zróżnicowaną grupę glutationowych-S-transferaz [EC 2.5.1.18.] wykazujących niską specyficzność substratową (Walter, 1993). Zdaniem Tate (1980) jedna z dwu podjednostek glutationowych-S-transferaz odpowiada za wiązanie z glutationem, natomiast druga z elektrofilnym substratem. Z danych Tate (1980) wynika, że powstały kompleks glutation-substrat pod wpływem  $\gamma$ -glutamylotransferazy [EC 2.3.2.2] (o wysokiej specyficzności tkankowej, gatunkowej i ontogenetycznej) ulega transformacji z odszczepieniem kwasu glutaminowego z kompleksu glutationowego. Z kolei cysteinylglicynodwupeptydaza [EC 3.4.13.6] katalizuje odłączenie glicyny, powodując ostatecznie utworzenie kompleksu ksenobiotyku z cysteiną. Powstały kompleks może ulec ekskrecji bezpośrednio lub po przemianie w kwas merkapturowy (acetylacja w grupie aminowej tioeteru cysteiny).

W niniejszych badaniach stwierdzono, że zastosowane w jednorazowej dawce dichlorvos (6 mg/kg), malation (350 mg/kg) i chlormequatu (600 mg/kg) wywołały zmiany zawartości GSH w wątrobie, mózgu, nerkach



i krwi. Podanie *per os* dichlorvosu i malionu wywołało w większości przypadków potwierdzony statystycznie spadek zawartości GSH w wątrobie, nerkach i mózgu. Obraz zmian koncentracji GSH w krwi był zróżnicowany w przypadku malionu i dichlorvosu. Malion spowodował wysoki i potwierdzony metematycznie wzrost badanego trójpeptydu w krwi zarówno po 1, jak i po 3 godzinach od czasu ekspozycji. Podanie dichlorvosu w zastosowanej dawce wywołało wzrost stężenia GSH (po 1 godzinie), a następnie spadek zawartości zredukowanego glutationu. Chlormequat w zastosowanej dawce i w badanych przedziałach czasowych wywołał spadek zawartości GSH w wątrobie, istotny tylko w przypadku przedziału 1 godzinnego oraz wzrost zawartości tego trójpeptydu w mózgu i krwi. Wykazano także statystycznie istotny spadek zawartości w nerce po 3 godzinach od czasu ekspozycji. Z danych literaturowych wynika, że w biotransformacji malionu (hydroliza karboksyestru) i dichlorvosu (hydroliza fosfotrójestru) dominującą rolę odgrywają fosfatazy i karboksylesterazy (Walter 1990). Obok kluczowych reakcji dla tych insektycydów istotną rolę spełniają dla dichlorvosu reakcje 0-demetylacji (układ oksydaz o mieszanym działaniu) lub alternatywnie reakcje katalizowane przez glutationową-S alkylotransferazę (Hodgson i Kulkarni 1974). Podobnie I etap biotransformacji malionu zależny jest od systemu oksydaz o mieszanej funkcji w dwu alternatywnych drogach.

Obserwowany w niniejszych badaniach spadek zawartości GSH w wątrobie, nerkach i mózgu po podaniu dichlorvosu jest, jak się wydaje, bezpośrednim skutkiem glutationowo-zależnych reakcji biotransformacyjnych tego pestycydu. Obniżenie zawartości GSH u zwierząt eksponowanych na malion, a w szczególności zaś na chlormequat jest wynikiem jak można sądzić dodatkowych pośrednich mechanizmów wywołujących uszkodzenia biochemiczne komórek. Obniżenie się poziomu GSH dokonuje się różnymi drogami. Najważniejszą jest utlenianie GSH do GSSG. Produkt utleniania jest następnie wydalany z hepatocytów. Inną drogą jest formowanie mieszanych dwusiarczków z białkowymi grupami sulfhydrylowymi (głównie drogą oksydacji lub arylicacji). Jednak jak sądzi Dziubek (1993) główną drogą obniżania zawartości GSH w komórce jest oksydacja. Zmiany stosunku białkowych i niebiałkowych grup sulfhydrylowych prowadzą ostatecznie do uszkodzeń biochemicznych, napływu jonów wapnia i ostatecznie śmierci komórek. Jak podaje Dziubek (1993) istnieje ścisła korelacja pomiędzy utratą niebiałkowych i białkowych tioli, peroksydacją lipidów, uszkodzeniami mitochondriów, mikrosomalnym wychwytem wapnia i nekrozą komórek.



Wzrost zawartości tego trójpeptydu w krwi po podaniu dichlorvosu, malationu i chlormequatu jest trudny do interpretacji. Miejscem syntezy GSH jest zarówno wątroba, jak i erytrocyty krwi. Z danych przytoczonych we wstępie wynika, że obrót GSH w obu tych tkankach jest wyraźnie zróżnicowany. Wiadomo jednak, że regulacja syntezy GSH *de novo* może zachodzić bezpośrednio przez aktywację  $\gamma$ -glutamylcysteinylo syntetazy i GSH-syntetazy. Trudno jednak przypuszczać, że aktywacja enzymów syntezy glutationu leży u podstaw działania tych zróżnicowanych chemicznie i metabolicznie związków. Czynnikiem stosunkowo istotnym w utrzymaniu układu GSH w stanie zredukowanym jest aktywność reduktazy glutationowej, której sprawność jest być może w erytrocytach większa. Niniejsze rozważania mogą być jednak zweryfikowane oznaczeniami aktywności reduktazy glutationowej w krwi i tkankach.

## Literatura

- Clement J.G., 1984, *Role of aliesterase in organophosphate poisoning*. Fundam. Appl. Toxicol. 4, 96–105.
- Cohen S.D., Williams R.A., Killinger J.M. and Freudenthal R.J., 1985, *Comparative sensitivity of bovine and rodent acetylcholinesterase to in vitro inhibition by organophosphate insecticides*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 81 452–459.
- Costa J.G., Schwab B.W. and Murphy S.D., 1982, *Differential alterations of cholinergic muscarinic receptors in chronic and acute tolerance to organophosphorus insecticides*. Biochem. Pharmacol. 31, 3407–3413.
- Dziubek K., 1993, *Metabolizm glutationu (GSH) w wybranych narządach żaby trawnej (Rana temporaria L.) w cyklu rocznym i w warunkach działania różnych czynników stresotwórczych*. Prace Monograficzne Nr 164, WSP, Kraków 5–89.
- Ellman G.L., 1959, *Tissue sulfhydryl groups*. Arch. Biochem. Biophys. 88, 70–79.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. and Fretherstom R.M., 1961, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.
- Gupta R.C., Patterson G.T. and Dettbarn W.D., 1985a, *Mechanisms involved in the development of tolerance to DFP toxicity*. Fund. Appl. Toxicol. 5, 17–28.
- Gupta R.C., Patterson G.T. and Dettbarn W.D., 1985b, *Mechanisms involved in the development of tolerance to DFP toxicity*. Fund. Appl. Toxicol. 5, 17–28.

- Gupta R.C. and Dettbarn W.D., 1987, *Alterations of high-energy phosphate compounds in skeletal muscles of rats intoxicated with diisopropylphosphorofluoridate 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.
- Hodgson E., Kulkarni A.P., 1974, *Interactions of pesticides with cytochrome P-450*. In: Mechanisms of Pesticide Action ed. Kohn G.
- Kobayashi H., Yuyama A. and Chiba K.I., 1986, *Cholinergic system of brain in rats poisoned with the organophosphate 0,0-dimethyl 0-(2,2-dichlorovinyl) phosphate*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 82, 32–39.
- Kołątaj A., 1986, *Fizjologiczna rola grup tiolowych*. Kieleckie Studia Biologiczne nr 3, 127–151.
- Lach H., Krawczyk S., Dziubek K., Szaroma W., Koczanowski B., 1988, *Wpływ insektycydu Pirimor 50 DP (5,6 dwumetyloamino-4-piryminylo-dwukarbaminian) na dobowe zmiany zawartości glutationu w krwi, mózgu, wątrobie i nerkach myszy*. W: Roczn. Nauk.-Dydakt., z. 118. Prace Fizjologiczne I, WSP, Kraków 95–111.
- Laskowski M.B. and Dettbarn W.D., 1979, *An electrophysiological analysis of the effects of paraoxon at the neuromuscular junction*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 210, 269–274.
- Meister A., 1973, *On the enzymology of amino acid transport*. Science 180, 33–39.
- Meister A., 1974, *New aspects of glutathione biochemistry and transport: Selective alterations of glutathione metabolism*. Federation. Proceed. vol. 43, 3031–3042.
- Takahashi H., Kojima T., Ikeda T., Tsuda T., Shirasu S., 1991, *Differences in the mode of lethality produced through intravenous and oral administration of organophosphorus insecticides in rats*. Fund. Appl. Toxicol. 18(3) 459–468.
- Tate S.S., 1980, *Enzymatic basis of detoxication* (Jakoby W.B. ed.) vol. 2, 15. Academic Press, New York.
- Walter Z., 1990, *Molekularny mechanizm adaptacji na insektycydy fosforoorganiczne*. W: Biologiczne mechanizmy procesów adaptacyjnych. Materiały z VIII Sympozjum 143–144.
- Walter Z., Gawrońska M., 1990, *Wpływ związków fosforoorganicznych na aktywność wybranych enzymów z grasicy świni*. W: Biologiczne mechanizmy procesów adaptacyjnych. Materiały z VIII Sympozjum 143–144.
- Yamada S., Isogai M., Okudaira H. and Hayashi E., 1983, *Correlation between cholinesterase inhibition and reduction in muscarinic receptors and choline uptake by repeated diisopropylfluorophosphate administration: Antagonism by antagonism by physostigmine and atropine*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 226, 519–525.

## **Changes of the Activity and Reduced GSH Contents in Animals Treated with Neurotoxins Belonging to the Pesticide Group**

### **Summary**

The influence of 3 chemically different and to a high extent pure pesticides on the AChE activity in the brain and muscles and on the contents of GSH in liver, kidney, brain and blood was examined. The research was carried out on adult male mice of white breed. Dichlorvos, Malathion and chlormequat were injected in single doses per os. The activity of AChE in brain and muscles was determined by Ellman's method (1961), whereas the contents of GSH in the liver, kidney and blood were determined by means of Ellman's method (1959).

The statistic analysis of the obtained results showed that the degree of AChE inhibition was the highest after the administration of dichlorvos, both in the brain and the muscle, and the lowest after Chlormequat.

The picture of changes in GSH contents in examined tissues following the administration of pesticides was quite different.

The administration of Chlormequat caused the most radical changes of the examined parametr after 3 hours. The changes observed after dichlorvos AND malathion treatment were quite similar to those caused by Chlormequat.

The changes observed after the administration of 3 different pesticides are highly varied and require further experimental verification.