

ANNA ŁUKASZEWICZ-HUSSAIN, JANINA MONIUSZKO-JAKONIUK

## ZMIANY W WĄTROBIE SZCZURA W PÓŹNYM OKRESIE ZATRUCIA CHLORFENWINFOSEM W DAWCE JEDNORAZOWEJ

### CHANGES IN RATS LIVER IN LATE PERIOD OF INTOXICATION WITH CHLORPHENVINPHOS IN SINGLE DOSE

Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. J. Moniuszko-Jakoniuk

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2

*Zbadano wpływ podania chlorfenwinfosu na aktywność enzymów wątrobowych w surowicy krwi i homogenacie wątroby szczura, 48 h po podaniu tego związku w dawce jednorazowej.*

#### WSTĘP

Insektycydy fosforoorganiczne, których przedstawicielem jest chlorfenwinfos należą do związków silnie toksycznych o wielokierunkowym działaniu [3, 5, 7, 8, 14].

Związek ten podany w dawce jednorazowej powoduje w 1 i 24 h po intoksykacji, wzrost aktywności w surowicy krwi enzymów wskaźnikowych takich jak: beta-glukuronidaza, fosfataza kwaśna, aminotransferaza alaninowa i asparaginianowa. Jednocześnie obserwowano zmiany aktywności tych enzymów w badanych frakcjach subkomórkowych [7].

Badania te wskazują na uszkodzenie komórki wątrobowej, co znajduje potwierdzenie w ocenie histologicznej narządu [9]. Obserwowane nasilenie procesów glikolitycznych w wątrobie (wzrost stosunku mleczan pirogronian, wzrost stężenia mleczanów, obniżenie stężenia pirogronianów) sugeruje, że mechanizm tego uszkodzenia może być związany z niedotlenieniem [8].

Ponieważ badania nad toksycznym wpływem chlorfenwinfosu na wątrobę prowadzono do 24 h po podaniu tego związku w dawce jednorazowej, w niniejszej pracy przedłużono je do 48 h, celem ustalenia czy zmiany w komórce wątrobowej cofnęły się czy też postępują nadal.

#### MATERIAŁY I METODY

Badania prowadzono na szczurach samcach rasy *Wistar* o masie ciała 180-200g. Zwierzęta pojąno wodą *ad libitum* i podawano paszę granulowaną standardową.

Szczurom podawano sondą dożołądkowo olej lub olejowy roztwór chlorfenwinfosu w dawce 0,5 LD<sub>50</sub> lub 0,1 LD<sub>50</sub>. Zwierzęta usypiano w 48 h po intoksykacji i pobierano krew z serca i skrawki wątroby.

Wątrobę homogenizowano w buforze Tris-HCl o pH 7,4, który zawierał 0,25 M sacharozy i 2mM EDTA i poprzez wirowanie frakcjonowane uzyskiwano frakcję cytozolową, lizosomalną i mitochondrialną [7, 8]. Z pobranej krwi uzyskiwano surowicę.

Wykonano następujące oznaczenia biochemiczne:

- aminotransferazy: asparaginianową (AspAT) i alaninową (AIAT) oznaczano przy użyciu gotowych zestawów La Chema, we frakcji cytozolowej i mitochondrialnej homogenatu wątroby oraz w surowicy krwi,
- beta-glukuronidazę (BGR) metodą wg *Bergmayera* [2] i kwasną fosfatazę (AcP) za pomocą zestawów La Chema we frakcji lizosomalnej homogenatu wątroby i w surowicy,
- dehydrogenazę mleczanową (LDH) przy użyciu zestawów La Chema we frakcji cytozolowej homogenatu wątroby,
- mleczany przy użyciu zestawów Sigma we frakcji cytozolowej homogenatu wątroby,
- białko metodą *Lowry* [6] we wszystkich badanych frakcjach homogenatu wątroby, celem przeliczenia jednostek aktywności enzymatycznej na g białka,
- cholinioesterazę metodą *Ellmana* [4] w surowicy krwi, jako wskaźnik zatrucia chlorfenwinfosem.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu *t-Studenta*, przyjmując wartości istotne statystycznie, wyniki różniące się przy  $p < 0,05$ .

## WYNIKI

W 48 h po badaniu chlorfenwinfosu w dawce jednorazowej stwierdzono, że aktywność ChE w surowicy krwi pozostawała zahamowana, w przypadku podania tego związku w dawce 0,5 LD<sub>50</sub>, nie różniła się natomiast istotnie statystycznie w stosunku do wartości zaaobserwowanych w grupie kontrolnej w przypadku niższej badanej dawki (Tab. I).

Aktywności enzymów wątrobowych AspAT, AIAT, AcP i BGR w surowicy krwi była istotnie statystycznie obniżona, w stosunku do kontroli, u zwierząt intoksykowanych chlorfenwinfosem (Tab. I). Największe obniżenie, aktywności enzymatycznej dotyczyło aktywności hydrolaz lizosomalnych – BGR i AcP.

Obserwowano też bardzo duże obniżenie aktywności BGR we frakcji lizosomalnej wątroby szczurów otrzymujących chlorfenwinfos (Tab. II). Obniżenie to nie było zależne od dawki związku. Aktywność fosfatazy kwasnej we frakcji lizosomalnej wątroby obniżyła się istotnie statystycznie, w stosunku do wartości grupy kontrolnej, po podaniu chlorfenwinfosu w dawce 0,1 LD<sub>50</sub> (Tab. II).

Aktywność AspAT wzrosła istotnie statystycznie w stosunku do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej, zarówno we frakcji cytozolowej jak i mitochondrialnej homogenatu wątroby szczurów otrzymujących chlorfenwinfos w niższej z badanych dawek. Zmiany te były istotne statystycznie również, w stosunku do wartości obserwowanych w grupie zwierząt otrzymujących chlorfenwinfos w dawce 0,5 LD<sub>50</sub> (Tab. III).

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian aktywności drugiej z badanych aminotransferaz – alaninowej (Tab. III).

Stwierdzono istotny statystycznie wzrost aktywności LDH we frakcji cytozolowej wątroby szczurów otrzymujących chlorfenwinfos w obu badanych dawkach. Aktywność tego enzymu była około dwukrotnie wyższa w stosunku do kontroli, a jej wielkość nie zależała od dawki związku (Tab. IV).

Tabela I. Aktywność enzymów w surowicy krwi szczurów.  
Activity of blood serum enzymes in the rats.

	ChE (U/dm <sup>3</sup> )	BGR (mg fenoloftaleiny/dm <sup>3</sup> )	AcP (U/dm <sup>3</sup> )	AspAP (μkat/dm <sup>3</sup> )	AlAT (μkat/dm <sup>3</sup> )
Kontrola (1)	1426,15 ± 211,26 n = 8	112,32 ± 12,42 n = 8	94,36 ± 8,21 n = 8	3,19 ± 0,57 n = 7	1,59 ± 0,23 n = 7
Chlorfenwinfos 0,5 LD <sub>50</sub> (2)	1034,32 ± 202,16 n = 5 p <sub>1-2</sub> < 0,002	41,38 ± 2,11 n = 5 p <sub>1-2</sub> < 0,001	13,08 ± 4,21 n = 5 p <sub>1-2</sub> < 0,0001	2,12 ± 0,82 n = 5 p <sub>1-2</sub> < 0,05	0,69 ± 0,12 n = 5 p <sub>1-2</sub> < 0,0001
Chlorfenwinfos 0,1 LD <sub>50</sub> (3)	1298,7 ± 312,02 n = 5	37,44 ± 5,26 n = 7 p <sub>1-2</sub> < 0,001	7,49 ± 2,98 n = 6 p <sub>1-2</sub> < 0,0001 p <sub>2-3</sub> < 0,05	2,36 ± 0,98 n = 6	0,75 ± 0,22 n = 6 p <sub>1-3</sub> < 0,0001

Tabela II. Aktywność BGR (mg fenoloftaleiny/g białka) i AcP (U/g białka) we frakcji lizosomalnej wątroby.  
Chlorfenwinfos Activity of BGR (mg phenolophtaleine/g protein) and the liver lysosomal fraction.

	Kontrola (1)	Chlorfenwinfos	
		0,5 LD <sub>50</sub> (2)	0,1 LD <sub>50</sub> (3)
BGR	190,5 ± 14,25 n = 7	39,66 ± 9,23 n = 5 p <sub>1-2</sub> < 0,0001	50,55 ± 9,89 n = 7 p <sub>1-3</sub> < 0,0001
AcP	25,24 ± 2,83 n = 7	21,82 ± 3,87 n = 7	17,56 ± 3,21 n = 7 p <sub>1-3</sub> < 0,001

Tabela III. Aktywność AspAT ( $\mu\text{kat/g}$  białka) A1AT ( $\mu\text{kat/g}$  białka) we frakcjach wątroby.  
Activity of GOT ( $\mu\text{cat/g}$  protein) and GPT ( $\mu\text{cat/g}$  protein) in the liver fractions.

		Kontrola (1)	Chlorfenwinfos			
			0,5 LD <sub>50</sub>		0,1 LD <sub>50</sub>	
			(2)		(3)	
	cytozol	mitochondria	cytozol	mitochondria	cytozol	mitochondria
AspAT	0,60 ± 0,08 n = 7	0,42 ± 0,04 n = 7	0,586 ± 0,116 n = 6	0,486 ± 0,158 n = 6	0,779 ± 0,096 n = 8 p <sub>1-3</sub> < 0,01 p <sub>2-3</sub> < 0,05	0,667 ± 0,056 n = 8 p <sub>1-3</sub> < 0,001 p <sub>2-3</sub> < 0,05
A1AT	1,52 ± 0,10 n = 7	0,63 ± 0,09 n = 7	1,668 ± 0,126 n = 6	0,808 ± 0,208 n = 6	1,514 ± 0, 316 n = 8	0,753 ± 0,219 n = 8

Tabela IV. Aktywność LDH (U/g białka) i stężenie mleczanów (mmol/g tkanki) we frakcji cytozolowej wątroby.  
Activity of LDH (U/g protein) and concentration of lactate (mmol/g tissue) in the liver cytosolic fraction.

	Kontrola (1)	Chlorfenwinfos	
		0,5 LD <sub>50</sub>	0,1 LD <sub>50</sub>
		(2)	(3)
Mleczały	12,82 ± 2,22 n = 6	25,64 ± 4,30 n = 5 p <sub>1-2</sub> < 0,01	14,66 ± 1,02 n = 8 p <sub>2-3</sub> < 0,05
LDH	672,15 ± 90,12 n = 6	1216,63 ± 121,12 n = 5 p <sub>1-2</sub> < 0,001	1292,31 ± 138,36 n = 8 p <sub>1-3</sub> < 0,001

Zaobserwowano też istotny statystycznie wzrost stężenia mleczanów w cytozolu szczurów otrzymujących chlorfenwinfos. Wzrost ten, w przypadku podania związku w dawce 0,5 LD<sub>50</sub> był istotnie statystycznie wyższy zarówno do wartości kontroli jak i do wartości tego parametru po podaniu chlorfenwinfosu w dawce 0,1 LD<sub>50</sub> (Tab. IV).

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania wykazały, że w 48 h zatrucia chlorfenwinfosem podanym w dawce jednorazowej, występują zmiany wszystkich badanych parametrów biochemicznych.

Aktywność ChE w surowicy krwi, wskaźnika zatrucia insektycydami fosforoorganicznymi, pozostaje zahamowana po podaniu tego związku w dawce 0,5 LD<sub>50</sub>. Z badań przeprowadzonych uprzednio wynika, że aktywność tego enzymu ulega bardzo gwałtownemu zahamowaniu w 1 h intoksykacji. Było to 90% zahamowanie w przypadku dawki 0,5 LD<sub>50</sub> i 50% w przypadku dawki 0,1 LD<sub>50</sub>, przy czym w 24 h aktywność tego enzymu przy wyższej dawce wynosiła ok. 50% wartości obserwowanej w grupie kontrolnej, a przy dawce niższej wracała do normy [7].

Badania dotyczące wpływu chlorfenwinfosu na enzymy wątrobowe wykazały, że dochodzi do obniżenia ich aktywności w surowicy krwi. Obniżenie to jest szczególnie gwałtowne w przypadku BGR, AcP i AIAT.

Zmiana aktywności w surowicy krwi BGR i AIAT jest niezależna od dawki związku. W przypadku fosfatazy kwaśnej natomiast, zaobserwowano istotną statystycznie różnicę aktywności tego enzymu pomiędzy grupą zwierząt otrzymujących chlorfenwinfos w dawce 0,5 i 0,1 LD<sub>50</sub>. Obniżonej aktywności AcP w surowicy krwi towarzyszyło zmniejszenie jej aktywności we frakcji lizosomalnej homogenatu wątroby, istotne statystycznie w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej przy dawce 0,1 LD<sub>50</sub>. Obserwowano też gwałtowne obniżenie, niezależne od dawki, aktywności BGR w tej frakcji wątroby. Nastąpił wzrost aktywności AspAT we frakcji cytozolowej i mitochondrialnej wątroby po podaniu chlorfenwinfosu w dawce 0,1 LD<sub>50</sub>, istotny statystycznie do wartości w grupie zwierząt otrzymujących chlorfenwinfos w dawce 0,5 LD<sub>50</sub>.

Insektocydy fosforoorganiczne powodują labilizację błon komórkowych i subkomórkowych, a wskutek tego procesu dochodzi do wypływu enzymów komórkowych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i do krwi [7, 8, 11]. We wcześniejszym okresie zatrucia chlorfenwinfosem obserwowano wzrost w surowicy krwi aktywności hydrolaz wątrobowych. Szczególnie gwałtowny wzrost aktywności dotyczył BGR w 1h zatrucia tym związkiem. W 24 h zatrucia aktywność tego enzymu obniżyła się (była jednakże wyższa niż w grupie kontrolnej) i był to proces szybszy w przypadku wyższej dawki. Aktywność drugiej badanej hydrolazy – AcP, w 1 i 24h zatrucia chlorfenwinfosem była również wyższa chociaż nie tak znacznie jak BGR [7].

We wcześniejszych badaniach wykazano także, wzrost aktywności AIAT w surowicy krwi oraz przejściowy wzrost AspAT. Zmianom aktywności aminotransferaz w surowicy towarzyszyły zmiany aktywności tych enzymów we frakcjach homogenatu wątroby [8].

Dane literaturowe jak i wyniki niniejszej pracy wskazują zatem, że w zatruciu chlorfenwinfosem dochodzi do uszkodzenia wątroby, czego wyrazem są obserwowane zmiany aktywności enzymów wątrobowych [3, 7, 8].

Znaczny wzrost aktywności badanych enzymów w 1 h po zatruciu chlorfenwinfossem z następnym gwałtownym zmniejszeniem ich aktywności w 48 h po zatruciu sugeruje, że komórka wątrobowa znalazła się w punkcie nieodwracalności toku śmierci. W 48 h po zatruciu chlorfenwinfossem dochodzi prawdopodobnie do zahamowania syntezy białek, stąd obserwowane zmniejszenie aktywności badanych enzymów w surowicy krwi. Obserwuje się wzrost stężenia mleczanów w cytozolu wątroby a co za tym idzie obniżenie pH komórki. Przenikanie mleczanów do światła siateczki śródplazmatycznej szorstkiej wywołuje jej obumieranie i utratę rybosomów [13].

W zatruciu chlorfenwinfossem dochodzi do nasilenia procesu glikolizy beztlenowej. We wcześniejszych badaniach obserwowano bowiem w cytozolu wątroby zatrutowanych szczurów wzrost stężenia mleczanów, glukozy z jednoczesnym obniżeniem stężenia pirogronianów i wzrostem stosunku mleczan/pirogronian. Stosunek ten jest markerem procesów glikolitycznych w wątrobie [9]. Podobne zmiany wymienionych wyżej parametrów obserwowano w zatruciach innymi insektycydami fosforoorganicznymi [1, 12].

Dodatkowo w badaniach histologicznych dotyczących wątroby w zatruciu fosforoorganikami, w tym chlorfenwinfossem, obserwowano uszkodzenia tego narządu [3, 10].

Obserwowano zmniejszenie nasilenia odczynu na glikogen już w 1 h po zatruciu chlorfenwinfossem w 24–48 h obserwowano zwyrodnienie wodniczkowe hepatocytów, ogniskowe zatarcie beleczkowej struktury narządu z cechami martwicy rozplywnej hepatocytów. W ogniskach komórek zmienionych martwiczo odczyn na glikogen był ujemny. Zmiany te nasilały się w 48 h po zatruciu chlorfenwinfossem w dawce 0,5 LD<sub>50</sub> [10].

Wyniki niniejszej pracy, jak też omówione wyżej dane literaturowe, prowadzą do konkluzji, że jednorazowe zatrucie chlorfenwinfossem powoduje nieodwracalne uszkodzenie komórki wątrobowej.

#### WNIOSKI

1. W 48 h po zatruciu ostrym chlorfenwinfossem, dochodzi do całkowitej normalizacji aktywności ChE w surowicy krwi po podaniu tego związku w niższej dawce i podobnej tendencji po podaniu tego związku w wyższej badanej dawce.

2. Obraz zmian pozostałych badanych parametrów w surowicy krwi i frakcjach homogenatu wątroby sugeruje, że w badanym okresie po intoksykacji dochodzi do nieodwracalnych zmian martwiczych w komórce wątrobowej.

A. Łukaszewicz-Hussain, J. Moniuszko-Jakoniuk

#### CHANGES IN RATS LIVER IN LATE PERIOD OF INTOXICATION WITH CHLORPHENVINPHOS IN SINGLE DOSE

##### Summary

The present investigation was undertaken to study the effect of chlorphenvinphos on the activity of liver enzymes in acute poisoning with this compound.

The investigation was carried out on male Wistar rats. The animals received oil - control group and oil solution of chlorphenvinphos in dose 0,5 or 0,1 LD<sub>50</sub> - the examined group, intragastrically.



Material for examination was collected in the 48 h after intoxication. Activity of GOT and GPT in a serum, cytosolic and mitochondrial fractions of liver; BGR and AcP in a serum and lysosomal fraction of liver, ChE in a serum and concentration of lactate in the cytosolic fraction of liver were assayed.

It can be concluded that in the 48 h after intoxication with chlorphenvinphos, activity of ChE was normalized in the case of lower dose and has such tendency in the case of higher dose.

The changes of other assayed parameters in the serum and liver homogenate indicates that in this period of study, the liver is in point of no return.

## PIŚMIENNICTWO

1. Begum G., Vijayaraaghavon S.: Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish. *Fd. Chem. Toxic.* 1995, 5, 423.
2. Bergmayer H.U.: Verlag Chemie. GMBH, WeinheimBergstr., 1962, 779.
3. Chishti M.A., Rotkiewicz T.: Hepatic and renal ultrastructural changes in cockerels exposed to cadmium chloride and subsequent interaction with organophosphate insecticides. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 1993, 12, 34.
4. Ellman G.L., Courtney D.K., Anders V. Jr., Featherstpn R.M.: A new rapid colorimetric determination on acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* 1961, 7, 88.
5. Gupta R.C., Goad J.T., Kadel W.L.: In vivo alteration in Lactate Dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes pattenrs by acute Carbofuran intoxication. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1991, 21, 263.
6. Lowry D.H., Rosenbrangh M.J., Farr A.L., Randall R.: Protein measurment with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951 193, 263.
7. Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J.: Activity of lysosomal enzymes in acute intoxication with organophosphorus insecticides. *Pol. Journ. of Environ. Studies*, 1997, 6, 51.
8. Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J., Galazyn-Sidoreczuk M.: Zmiany aktywności aminotferaz w surowicy krwi i frakcjach homogenatu wątroby w zatruciu chlorfenwinfosem. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1996, 29, 279.
9. Łukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J.: Procesy glikolityczne w wątrobie szczura w zatruciu chlorfenwinfosem. *Med. Pracy* 1997, 5, 579.
10. Łukaszewicz-Hussain A., Chyczewski L., Moniuszko-Jakoniuk J.: Stężenie mleczanów i glukozy w surowicy krwi oraz glikogenu w wątrobie w ostrym zatruciu chlorfenwinfosem. *Praca przesłana do druku.*
11. Matuszewski W., Kamiński K.: Znaczenie diagnostyczne oznaczania aktywności beta-glukuronidazy. *Wiad. Lek.* 1973, 26, 1509.
12. Pawłowska D., Moniuszko-Jakoniuk J., Łukaszewicz-Hussain A.: Effect of pesticides on selected biochemical parameters in the serum and liver rats. *Roczn. Akad. Med. Białystok* 1990-91, 35, 143.
13. Siegiel A., Kamiński M.: Toksyčna śmierć komórki. *Acta Polon. Toxicol.*, 1994, 2, 95.
14. Sultatos L.G.: Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 1994, 43, 271.

Otrzymano: 1997.11.15