DANUTA PALUT, WIESŁAW GRZYMAŁA

WCHŁANIANIE, PRZEMIESZCZANIE W TKANKACH I WYDALANIE TIONOFOSFORANU 0,0-DWUMETYLO-0-2,4,5-TRÓJCHLOROFENYLU (FENCHLORFOSU) U SZCZURÓW

Z Zakładu Toksykologii Sanitarnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr *A. Bojanowska*
Z Zakładu Ochrony Radiologicznej i Radiobiologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: dr med. *T. Majle*

Badano wchłanianie, dystrybucję w tkankach (wątrobu, nerki, mózg, krew) i wydalania fenchlorfosu-^{32}P u szczurów. Związek ten podany doustnie w dawce 10 mg/kg ciężaru ciała, był szybko resorbowany z przewodu pokarmowego szczura i wydalany głównie z moczem i w dużo mniejszym stopniu z kałem w czasie pierwszej doby cyklu doświadczalnego. Nasilanie się i spadek radioaktywności we krwi i w mózgu przebiegały nieco odmiennie; śladowe ilości ^{32}P nie wykazywały tendencji spadkowej w obu badanych tkankach. Wśród produktów wydalanych z moczem i kałem nie stwierdzono obecności analogu tlenowego badanego związku.

0,0-dwumetylo-0-2,4,5-trójchlorofenylo-tionofosforan (fenchlorfos) wykazuje właściwości owadobójcze i pasożytnicze [1, 2, 3, 4,], w związku z czym znajduje zastosowanie w akcjach sanitarnych oraz w weterynarii jako lek do zewnętrznego i wewnętrznego użytku, zwalczający ektopasożyty zwierząt domowych, z gromady owadów, pajęczaków i nicieni *).

Dotychczasowe badania farmakologiczne dostarczyły pewnych informacji o losie preparatu w ustroju ssaków. Wykazano mianowicie, że u szczurów około 70% podanej doustnie dawki (100 mg/kg) zostaje wydalone głównie z moczem i w dużo mniejszym stopniu z kałem [5]. Badania te nie wyjaśniły jednak czy substancja wprowadzona do organizmu ulega aktywacji do oksonu. Nie jest to oczywiście jedyna przemiana jakiej może podlegać fenchlorfos, jednakże ze względu na dużą toksyczność połączeń zawierających grupę P = 0, zachodzący proces aktywacji mógłby stanowić niebezpieczeństwo dla organizmu zwierzęcego.

Plapp i *Casida* [5] oraz *Stiansi* i współpracownicy [6] opublikowali wyniki badań, z których wynika, że głównym metabolitem w moczu szczurów potraktowanych fenchlorfosem oraz pokrewnym związkiem fosforoorganicznym bromofosem, były pochodne demetylowe oraz kwas dwumetylofosforowy. Nie wyjaśniono jednak, czy metabolit ten był wyni-

*) Preparat krajowy nosi nazwę Dermafos.

kiem rozkładu hydrolitycznego tworzącego się oksonu, czy też powstawał drogą utlenienia dwumetylotionofosforanu.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wchłaniania, dystrybucji i wydalania fenchlorofosu znaczonego ^{32}P u szczurów. Obserwacje dotyczyły wydalania z moczem i kałem, dystrybucji w trzech wybranych narządach jak wątroba, nerki i mózg oraz kumulacji we krwi pełnej, osoczu i krwinkach, po doustnym podaniu związku.

Interesowało nas również zagadnienie, czy i w jakim stopniu podana dawka fenchlorfosu ulega przekształceniu w analog tlenowy w organiźmie szczura.

METODYKA

Badania prowadzono na szczurach szczepu *Wistar*, samcach o ciężarze około 150 g. Zwierzęta, umieszczone pojedynczo w specjalnych klatkach metabolicznych, pozostawały przez 7 dni przed doświadczeniem jak i w czasie trwania eksperymentu na stałej diecie *) i dostawały wodę ad libitum. Roztwory olejowe fenchlorfosu-^{32}P, firmy *Amersham* i fenchlorfosu nieznaczonego, firmy Polyscience Corporation podawano sondą do żołądka w dawce 10 mg/kg ciężaru ciała.

Wydalanie fenchlorofosu oznaczano po 24, 48 i 72 godzinach na łącznej liczbie 9 szczurów. W tym celu zbierano dobowe próbki moczu i kału oznaczając każdorazowo objętość moczu i ciężar kału od poszczególnych osobników. Kał przed wykonaniem pomiarów radiometrycznych ekstrahowano chloroformem. W próbkach moczu i ekstraktach chloroformowych kału (pozostały po ekstrakcji osad nie zawierał radioaktywności) oznaczano zawartość ^{32}P metodą stałej scyntylacji.

Stopień dystrybucji fenchlorfosu i jego metabolitów w wątrobie, nerkach i mózgu określano po 6, 12, 24, 48 godzinach. Narządy wypreparowywano od dekapitowanych zwierząt poddanych uprzednio narkozie eterowej. Oddzielone tkanki ważono, spłukiwano roztworem soli fizjologicznej i próbki o ciężarze 1 g homogenizowano w acetonie. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymane osady suszono nad pięciotlenkiem fosforu i oznaczano zawartość ^{32}P.

Ciałka krwi i osocze otrzymywano z 1 ml krwi w sposób następujący: próbki krwi wirowano w ciągu 20 minut przy 3000 obr./min. i oddzielano osocza. Otrzymany osad krwinek wypłukiwano trzykrotnie roztworem soli fizjologicznej za każdym razem wirując, a następnie hemolizowano roztworem wodorotlenku sodowego. Badania powtórzono dwukrotnie na grupach zwierząt liczących po 9 osobników.

Przeprowadzono również próby oznaczenia fenchlorofosu oraz jego analogu tlenowego w wyciągach chloroformowych z kału i moczu, pobranych po 6, 12 i 24 godzinach. Badania wykonywano metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym, w układzie rozpuszczalników n-heksan-aceton (4 : 1). Po rozwinięciu chromatogramów płytki dzielono na segmenty 1-centymetrowe, które po wyskrobaniu poddawane były kolejno pomiarom radiometrycznym. Plamy na płytkach lokalizowano stosując 0,5% roztwór $PdCl_2$—HCl. i pary bromu. Identyfikację przeprowadzono przez porównanie chromatograficzne z substancjami wzorcowymi: fenchlorfosem preparatem wzorcowym firmy Polyscience Corporation i oksonem fenchlorfosu otrzymanym drogą utleniania produktu macierzystego kwasem nadoctowym [7]. Produkty demetylacji i degradacji hydrolitycznej wydalane z moczem nie były rozdzielane i identyfikowane.

*) Pasza granulowana produkcji Wytwórni Pasz w Łowiczu

POMIARY RADIOMETRYCZNE

Pomiary radiometryczne próbek moczu, wyciągów chloroformowych kału, osadów z tkanek i zeskrobin przeprowadzono przy użyciu sondy scyntylacyjnej typu SSU-4 ze scyntylatorem plastikowym, umieszczonym w domku ołowianym typu DO-1, oraz przelicznika elektronowego typu PEL-5. Pomiary aktywności zawartej we krwi pełnej, osoczu, krwinkach i w tkance mózgowej wykonywano przy użyciu głowicy przeznaczonej do oznaczeń małych aktywności promieniowania beta, typu UGB-2, wyposażonej w dwa liczniki G-M, pracujące w układzie koincydencji. Przed wykonaniem pomiarów ciekłe próbki objętości 0,5 ml odparowywano do sucha na miseczkach aluminiowych w strumieniu zimnego powietrza.

WYNIKI

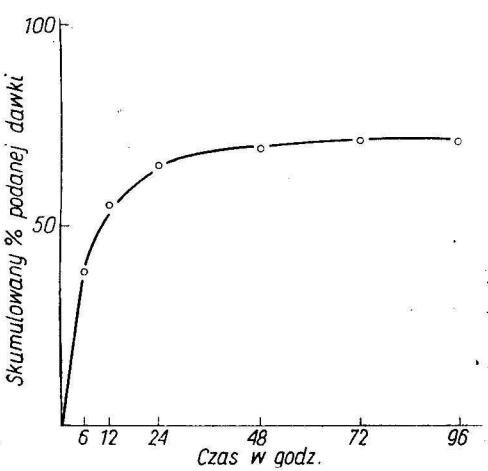
Liczbowe zestawienie średnich wartości obrazujących wydalanie fenchlorofosforu-^{32}P z moczem i kałem oraz graficzne opracowanie wyników wydalania z moczem ilustruje tabela I i rycina 1.

Otrzymane wyniki wskazują, że wydalanie fenchlorfosu przebiegało bardzo szybko w ciągu pierwszych godzin od podania preparatu i po upływie 24 godzin 74,2% zastosowanej dawki eliminowane było

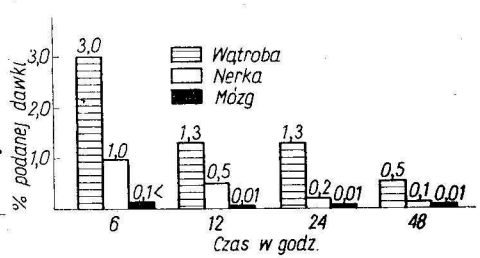
Tabela I

Wydalanie radioaktywności przez szczury po doustnym podaniu fenchlorfosu-^{32}P w dawce 10 mg/kg ciężaru ciała

Czas godz.	Procent podanej dawki		
	mocz	kał	mocz + kał
24	60,5	14,0	74,5
48	10,1	1,0	11,1
72	3,6	0	3,6
Procent odzyskanej radioaktywności	74,2	15,0	89,2



Ryc. 1.



Ryc. 2.

Ryc. 1. Wydalanie radioaktywności z moczem po doustnym podaniu szczurom fenchlorfosu-^{32}P w dawce 10 mg/kg ciężaru ciała.

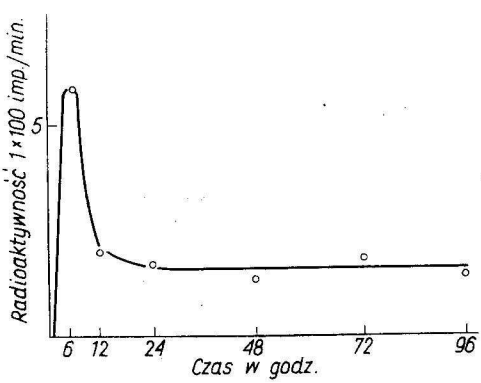
Ryc. 2. Dystrybucja radioaktywności w wątrobie, nerkach i mózgu po doustnym podaniu szczurom fenchlorfosu-^{32}P w dawce 10 mg/kg ciężaru ciała.

głównie z moczem (60,5%) i w dużo mniejszym stopniu z kałem (14,0%). Łączny odzysk radioaktywności po zakończeniu cyklu doświadczalnego nie przekraczał 89,2%. Wydaje się, że obserwacje te pozostają w pewnym związku z doniesieniami innych autorów [6, 8, 9], z których wynika, że nie całkowity odzysk spowodowany jest wbudowywaniem się śladowych ilości nieorganicznego fosforanu, końcowego etapu metabolizmu związków fosforoorganicznych do ogólnej puli fosforanowej organizmu.

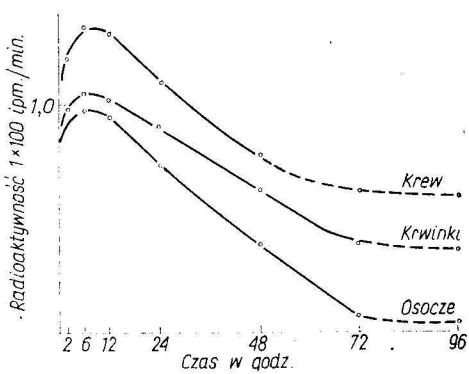
Rycina 2 przedstawia stopień dystrybucji fenchlorfosu w wątrobie, nerkach i mózgu. Jak wskazują dane doświadczalne, najwyższy procent zastosowanej dawki występował po 6 godzinach w wątrobie (3,0%) a następnie w nerce (1,0%) po czym obserwowano stopniowy spadek poziomu ^{32}P w obu badanych narządach. W przeciwieństwie do wątroby i nerek tkanka mózgowa zawierała śladowe ilości ^{32}P, wynoszące mniej niż 0,1%, utrzymujące się jednak w okresie od 12 do 48 godzin na tym samym poziomie.

W celu określenia czy fenchlorfos lub jego metabolity wiążą się w sposób trwały z tkanką mózgową, przeprowadzono dodatkowe badania, pobierając wycinki wymienionej tkanki w odstępach 6, 12, 24, 48, 72 i 96 godzin. Pomiary radiometryczne wykonywano przy użyciu głowicy przeznaczonej do oznaczeń małych aktywności promieniowania beta. Uzyskane wyniki przedstawione na rycinie 3. W procesie zanikania radioaktywności z tkanki mózgowej można wyróżnić dwa etapy. Po 6 godzinach stwierdzono maksymalny wzrost poziomu ^{32}P, a następnie raptowny spadek, po czym w okresie od 24 do 96 godzin nie obserwowano wydalania ^{32}P z badanej tkanki.

Graficzne opracowanie wyników obrazujących dystrybucję we krwi pełnej, osoczu i krwinkach ilustruje rycina 4. Wprowadzona doustnie dawka fenchlorofosu wywoływała u szczurów znaczny wzrost ^{32}P w w/w składnikach krwi, przypadający na około 9 godzin od podania preparatu po czym następowało znamienne obniżenie poziomu ^{32}P w krwi, osoczu i krwinkach. Jednakże już po upływie 72 godzin śladowe ilości radioaktywności nie wykazywały tendencji spadkowej. Nie stwierdzono różnic w dystrybucji pomiędzy elementami morfologicznymi krwi.



Ryc. 3.



Ryc. 4.

Ryc. 3. Zanikanie radioaktywności w tkance mózgowej po doustnym podaniu szczurom fenchlorfosu-^{32}P w dawce 10 mg/kg ciężaru ciała.

Ryc. 4. Zanikanie radioaktywności w pełnej krwi, osoczu i krwinkach po doustnym podaniu szczurom fenchlorfosu-^{32}P w dawce 10 mg/kg ciężaru ciała.

Wyniki chromatografii cienkowarstwowej wykazały, że badany związek wydalany jest z kałem jedynie w niezmienionej postaci. Równocześnie wśród produktów wydalanych z moczem po 6, 12 i 24 godzinach nie stwierdzono obecności ani niezmienionego fenchlorofosu ani oksonu. Omówione wyniki zbliżone są do wyników uzyskanych przez innych autorów [5, 6], którym również nie udało się zidentyfikować analogu tlenowego wśród wydalanych produktów.

Stiansi [6] podaje, że dają się one interpretować w dwojaki sposób. Można przyjąć, że przyczyną niewykrywalności analogu tlenowego jest jego szybkie zanikanie na skutek degradacji hydrolitycznej, bądź też że proces przemian metabolicznych nie przebiega drogą aktywacji do oksonu. Pośrednim dowodem przemawiającym za hipotezą biorącą pod uwagę proces powstawania analogu tlenowego *in vivo*, jest niskie oddziaływanie fenchlorfosu *in vitro* na aktywność cholinoesterazy [7]. Ponadto wyniki naszych badań *in vitro* [10] wykazały, że układy enzymatyczne mikrosomów wątroby szczura z dodatkiem zredukowanych nukleotydów pirydynowych, powodowały przekształcenie fenchlorfosu w okson, którego ilość w czasie półgodzinnej inkubacji wynosiła 6,6% ogólnej zawartości produktów rozpuszczalnych w chloroformie. Z drugiej strony okson fenchlorfosu [11] był szybko rozkładany przez supernatant pomitochondrialny wątroby szczura z dodatkiem zredukowanego glutationu. Procent hydrolizy po 10 i 30 minutowej ekspozycji oksonu z preparatami wątroby wynosił odpowiednio 80% i 90%.

WNIOSKI

1. Przy doustnym podaniu w dawce 10 mg/kg ciężaru ciała, fenchlorfos był łatwo resorbowany z przewodu pokarmowego szczura i wydalany głównie z moczem w ciągu pierwszej doby cyklu doświadczalnego.

2. Nasilanie się i spadek radioaktywności przebiegały nieco odmiennie we krwi i mózgu. W mózgu po 6 godzinach następował maksymalny wzrost poziomu ^{32}P a następnie raptowny spadek, po czym w okresie od 24—96 godzin nie obserwowano wydalania ^{32}P z badanej tkanki. We krwi, osoczu i krwinkach wzrost ^{32}P przypadał na około 9 godzin od zastosowania preparatu, po czym następowało obniżenie się ilości ^{32}P w w/w składnikach krwi. Jednakże po upływie 72 godzin śladowe ilości radioaktywności nie wykazywały tendencji spadkowej. Nie stwierdzono różnic w dystrybucji pomiędzy elementami morfotycznymi krwi.

3. Wyniki chromatografii cienkowarstwowej wykazały, że fenchlorfos wydalany jest z kałem jedynie w postaci niezmienionej. Równocześnie wśród produktów eliminowanych z moczem nie stwierdzono obecności niezmienionego związku i jego oksonu.

Д. Палют, В. Гржимала

ПОГЛОЩЕНИЕ, РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В ТКАНЯХ И ВЫДЕЛЕНИЕ ТИОНОФОСФОРАНА 0,0-ДИМОТИЛ-0-2,5-ТРИХЛОРФЕНИЛА (ФЕНХЛОРФОСА) У КРЫС

Содержание

Исследовано поглащение и распределение в тканях (печень, почки, мозг, кровь) и выделение фенхлорфоса-^{32}П у крыс.

Это соединение подаваемое per os в дозе 10 мг/кг веса тела было быстро поглащено желучочно-кишечным трактом и выделено главным образом с мочей

(60,5%) и в меньшей степени с калом (14%) в продолжении суточного подопытного цикла. Усиление и падение радиоактивности протекали в крови и в мозгу немногим иначе; следовые количества ^{32}Г непроявляли уменьшающей тенденции в обеих исследуемых тканях.

Результаты хроматографии в тонком слое показали что исследуемое соединение выделяется с калом в неизмененном состоянии Одновременно среди продуктов удаляемых с мочей не констатировано неизмененного соединения и его оксона.

D. Palut, W. Grzymała

ABSORPTION, TISSUE DISTRIBUTION, AND EXCRETION OF 0,0-DIMETHYL-0-2,4,5-TRICHLORPHENYL-PHOSPHOTHIOATE (FENCHLORPHOS) IN RATS

Summary

Fenchlorphos-^{32}P was administered orally to rats (at 10 mg per kg of body weight) and the degree of gastrointestinal absorption, the rate and routes of excretion, and the distribution in some tissues were determined.

The investigation showed that the compound and its labelled metabolites were eliminated by the rats primarily in the urine (60.5%) and to smaller extent through the faeces (14.0%). The excretion was most rapid during the initial 24 hours, gradually subsiding until only trace amounts were found after 72 hours.

The studies on the distribution and the disappearance in the brain tissue and the blood showed a different picture; trace amounts of ^{32}P persisted there and showed no tendency to decrease.

The results obtained by thin-layer chromatography revealed the presence in the faeces of only the unchnged compound. Neither unchanged fenchlorphos nor its oxygen analog were observed among the products excreted in the urine.

PIŚMIENNICTWO

1. *McCollister D. D., Oyen R., Rowe V. K.:* J. Agr. Food Chem., 1959, 10, 689. — 2. WHO Techn. Rep., Ser. 443, 1970. — 3. *McGregor W. S., Brushand R. C.:* J. Econ. Entomol., 1957, 50, 246. — 4. *Roth A. R., Eddy G. W.* J. Econ. Entomol., 1957, 50, 244. — 5. *Plapp F. W., Casida J. E.:* J. Agr. Food Chem., 1958, 9, 662 .— 6. *Stiansi M., Rehbinder D., Deckers W.:* J. Agr. Food Chem., 1967, 15, 474. — 7. *Palut D., Jończyk H. B., Syrowatka T.:* Roczniki PZH, 1967, 5, 527. — 8. *Ford I. M., Menn J. J., Meyding G. D.:* J. Agr. Food Chem., 1966, 1, 83. — 9. *O'Brien R. D.:* Toxic phosphorus esters, Academic Press, New York, London, 1960. — 10. *Palut D., Grzymała W., Syrowatka T.:* Roczniki PZH, 1969, 4, 471.

11. *Palut D., Grzymała W., Syrowatka T.:* Roczniki PZH, 1969, 5, 551.

Dn. 23-V-1971 r.

Warszawa, ul. Chocimska 24.