

DANUTA WITKOWSKA, REGINA OŁĘDZKA, ŁUKASZ SĘDROWICZ

BADANIE SKOJARZONEGO DZIAŁANIA MIESZANIN PESTYCYDÓW
Z RÓŻNYCH GRUP CHEMICZNYCH NA WCHŁANIANIE
WAPNIA W JELICIE SZCZURA *.
CZĘŚĆ II. CHLORFENWINFOS I CYPERMETRYNA

STUDIES ON THE COMBINED EFFECT OF MIXTURES OF PESTICIDES
BELONGING IN DIFFERENT CHEMICAL GROUPS ON CALCIUM
ABSORPTION IN RAT INTESTINE.
PART II. CHLORFENVINPHOS AND CYPERMETHRIN

Z Zakładu Bromatologii Instytutu Biofarmacji, AM w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. R. Ołędzka

Badano wpływ pojedynczych pestycydów-chlorfenwinfosu i cypermetryny oraz ich mieszaniny na wchłanianie wapnia przez skrawki dwunastnicy szczura.

WSTĘP

Prezentowana praca jest kontynuacją badań wykonanych w Zakładzie Bromatologii dotyczących oddziaływania pestycydów na metabolizm wapniowo-fosforanowy. Jednym z ważnych elementów homeostazy tych pierwiastków jest ich wchłanianie w jelicie, dlatego temu zagadnieniu poświęcono szczególną uwagę. Do badań transportu wapnia zastosowano zmodyfikowaną przez autorów metodę *Papwortha i Patricka* [8], która pozwala na określenie udziału w transporcie wapnia transportów – aktywnego i biernego.

W części I pracy badano wychwyty wapnia przez skrawki dwunastnicy szczurów narażonych wielokrotnie (14 dni) na tiuram i dichlorfos w dawce 5% DL₅₀ oraz ich mieszaninę. Celem części prezentowanej obecnie było określenie wpływu na ten parametr pojedynczych pestycydów – chlorfenwinfosu i cypermetryny oraz ich mieszaniny. Dla realizacji tego celu zastosowano model doświadczalny opisany w części I.

MATERIAŁY I METODY

Badania wykonano na 5-6 tygodniowych szczurach samcach szczepu *Wistar*. Zwierzęta otrzymywały paszę LSM i wodę *ad libitum*. Po tygodniowym okresie adaptacji do warunków zwierzętarni zakładowej, podzielono je na 4 grupy. Szczury kontrolne - grupa I otrzymywały *per os* sondą dożołądkowo 0,5 cm³ oleju sojowego. Szczurom grupy II podawano olejowy roztwór chlorfenwinfosu w dawce odpowiadającej 5% DL₅₀ (0,75 mg/kg) pięć razy w tygodniu przez 14 dni. Grupa III otrzymywała

* Praca wykonana w Centralnym Programie Badań Podstawowych 05.08.

w ten sam sposób olejowy roztwór cypermetryny w dziennej dawce 5% DL₅₀ (18 mg/kg). Natomiast szczury grupy badanej IV otrzymywały chlorfenwinfos i cypermetrynę dożyłdkowo w postaci olejowych roztworów w dawce 5% DL₅₀ każdego. Po 14 dniach zwierzęta zabijano przez dekapitację, izolowano 5-cio centymetrowe odcinki jelita tuż za żołądkiem (dwunastnica) i przygotowano z nich skrawki wg *Schachtera* i wsp. [10].

Wchłanianie wapnia przez skrawki dwunastnicy oznaczano metodą *Papwortha* i *Patricka* [8] w modyfikacji autorów. Szczegóły dotyczące metodyki badań oraz interpretacji matematycznej wyników przedstawiono w części I pracy [14].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań przedstawia rycina 1.

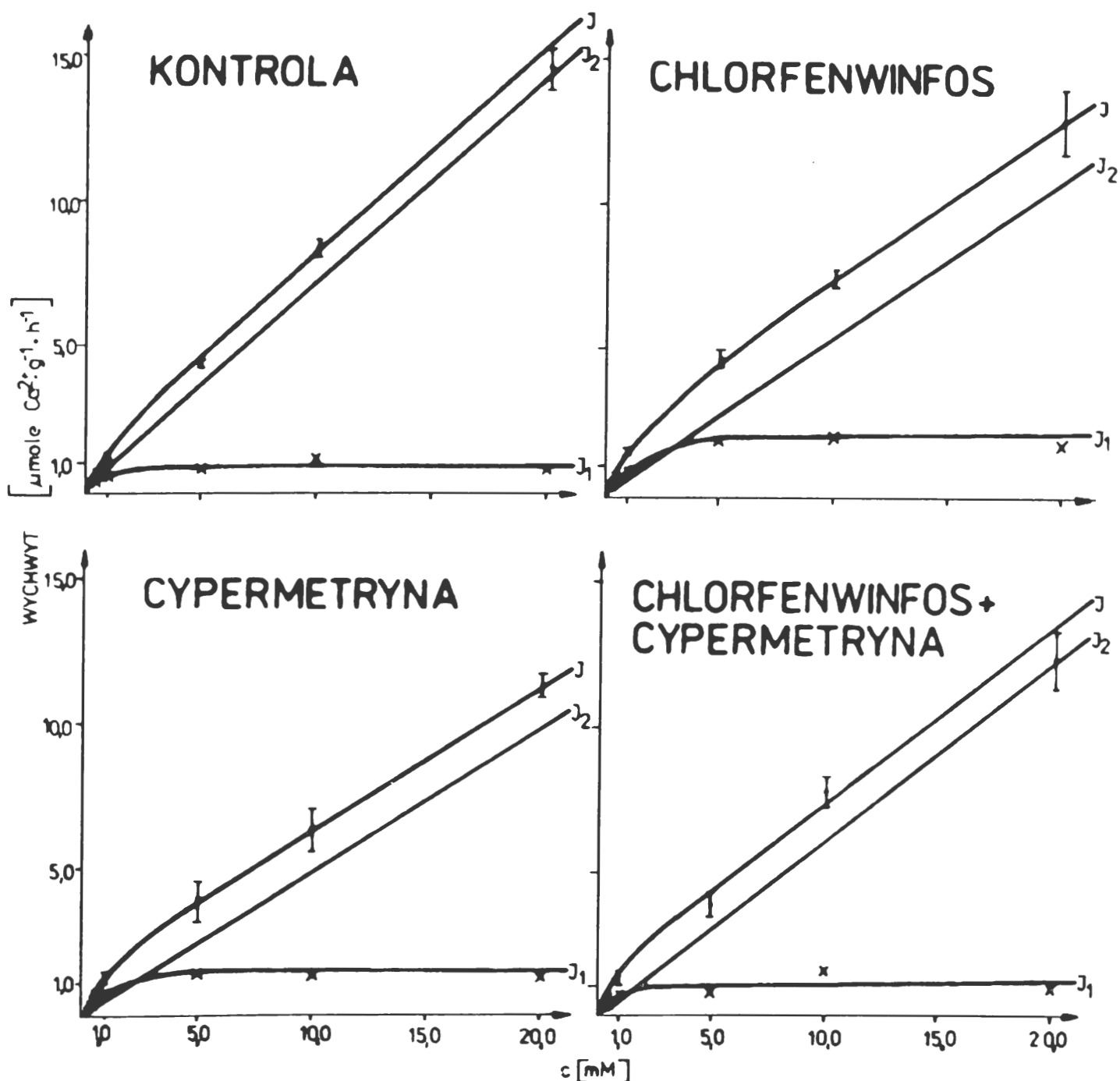
W przypadku szczurów narażonych przez 14 dni na chlorfenwinfos wykazano, że pestycyd ten w warunkach doświadczenia powoduje niewielkie zmiany w wydajności transportu całkowitego wapnia. Dopiero analiza matematyczna i wyliczenie stałych kinetycznych opisujących transport aktywny i bierny wskazują, że chlorfenwinfos zaburza obydwie te procesy.

Tabela I. Stałe kinetyczne opisujące transport aktywny wapnia w jelicie szczurów narażonych na działanie pestycydów

Kinetic constants describing active transport of calcium in the intestine of rats exposed to pesticides

Grupa zwierząt otrzymująca	Transport aktywny			Transport bierny
	Równanie prostej <i>Lineweaver - Burka</i>	Transport maksymalny J _m (μM/gh)	Stała wysycenia K _t (mM/dm ³)	Współczynnik kierunkowy prostej P (cm ³ /gh)
Olej sojowy Kontrola	$J_1^{-1} = 0.74 + 1.01 \cdot \frac{1}{(Ca^{+2})}$	0.99 (0.83 - 1.22)	0.73 (0.62 - 0.89)	0.72
Chlorfenwinfos	$J_1^{-1} = 0.64 + 0.43 \cdot \frac{1}{(Ca^{+2})}$	2.32* (2.12 - 2.56)	1.49* (1.36 - 1.64)	0.55
Cypermetryna	$J_1^{-1} = 0.75 + 0.66 \cdot \frac{1}{(Ca^{+2})}$	1.52* (1.37 - 1.69)	1.14* (1.03 - 1.27)	0.50
Chlorfenwinfos + Cypermetryna	$J_1^{-1} = 0.86 + 0.80 \cdot \frac{1}{(Ca^{+2})}$	1.25 (0.93 - 1.89)	1.07 (0.82 - 1.62)	0.62

I tak transport aktywny wapnia w porównaniu z kontrolą, charakteryzuje się u zwierząt grupy badanej otrzymującej ten pestycyd istotnym statystycznym wzrostem wartości stałej J_m (odpowiednio 0,99 μM/g · h i 2,32 μM/g · h). W wyniku podawania tego pestycydu zmienia się także powinowactwo wapnia do nośnika – znamienne statystycznie przy poziomie ufności α = 0,05 wzrost wartości stałej K_t o ponad 100% (tabela I, rycina 2). Transport bierny badanego pierwiastka był obniżony o około 25% (rycina 1, tabela I). Słaba stymulacja transportu aktywnego i niewielka inhibicja dyfuzji biernej dają w efekcie nieznaczne zmiany w transporcie całkowitym.



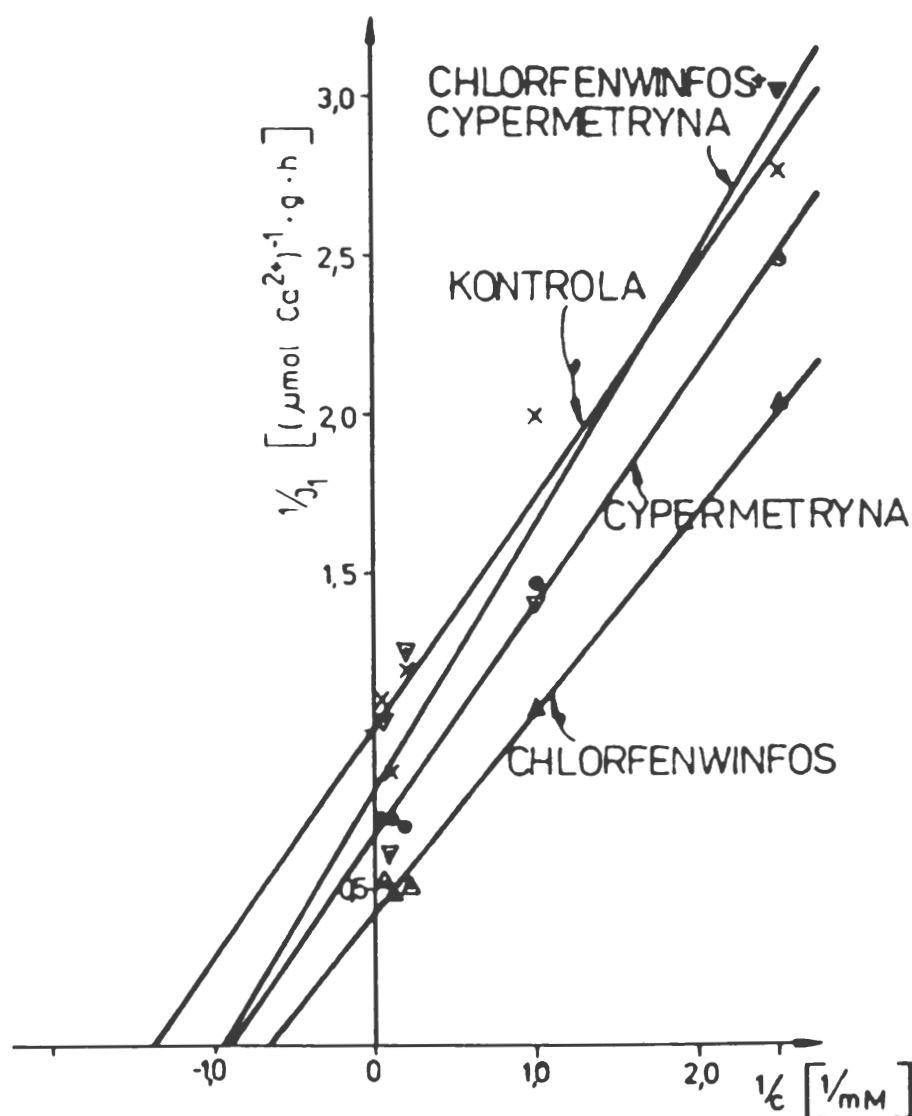
Ryc. 1. Wychwyt wapnia przez skrawki dwunastnicy szczurów kontrolnych, narażonych na chlorfenvinfos i cypermetrynę oraz ich mieszaninę (J – wychwyt całkowity, J_1 – wychwyt aktywny, J_2 – wychwyt bierny).

Fig. 1. Calcium uptake by duodenal sections of control rats as well as of rats exposed to chlorfenvinphos, cypermethrin and their mixture (J – total uptake, J_1 – active uptake, J_2 – passive uptake).

Otrzymane w tej części wyniki trudno jest porównywać z wynikami innych autorów. W latach 70-tych badano działanie chlorfenvinfosu na niektóre czynniki regulujące gospodarkę wapniowo-fosforanową ustroju tj. absorpcja jelitowa, procesy związane z mineralizacją i resorpcją kości [4, 5, 7, 12, 13]. Wykazano wtedy, że pestycyd ten powoduje nieznaczną stymulację wchłaniania wapnia czego miarą był podwyższony poziom ^{45}Ca w surowicy krwi szczurów narażonych na działanie chlorfenvinfosu po podaniu izotopu wapnia per os (4). Mimo różnic metodycznych wyniki opisanych wyżej badań są zgodne z naszymi obserwacjami.

W przypadku cypermetryny wykazano obniżenie wydajności transportu całkowitego (tabela I, rycina 1). Analiza wartości stałych kinetycznych opisujących transport aktywny wskazuje na istotny statystycznie wzrost wartości stałej J_m i K_t (tabela I, rycina 2). Pyretroid w warunkach doświadczenia hamował w około 35% dyfuzję bierną (tabela I).

Pyretroidy, których przedstawicielem jest cypermetryna są stosunkowo nową klasą insektycydów. Związki te są obecnie przedmiotem badań toksykologicznych prowadzonych na całym świecie. Wynika z nich, że jednym z kierunków ich działania na organizmy wyższe jest gospodarka wapniowa (1). Wpływ perytroidów na aktywność enzymów tj. Ca^{2+} , Mg^{2+} - ATPaza, Ca^{2+} - ATPaza (2, 9, 11), cyklaza adenylowa (11), Na^{2+} , K^{2+} - ATPaza czy metabolizm fosfatydyloinozytolu (3, 6) wskazywać może na możliwość naruszenia w komórce procesów związanych z aktywnym przeniesieniem jonów czy cząsteczek oraz zmieniać może przepuszczalność błon komórkowych. Są to jednak tylko przypuszczenia, które wymagają dalszych badań.



Ryc. 2. Krzywe Lineweavera-Burka dla aktywnego wychwytu wapnia przez skrawki dwunastnicy szczura.

Fig. 2. Lineweaver-Burk curves for active uptake of calcium by rat duodenal sections.

Łączne podawanie chlorfeninfosu i cypermetryny w dawce 5% DL_{50} każdego pestycydu powodowało nieznaczne obniżenie wydajności transportu całkowitego (ta-

bela I, rycina 1). W doświadczeniu tym nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartościach stałych opisujących transport aktywny między grupą badaną i kontrolną (tabela I, rycina 2). Transport bierny był natomiast obniżony o 15%.

Porównanie wartości stałych kinetycznych J_m i K_t dla wszystkich możliwych grup doświadczalnych przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Ocena statystyczna stałych kinetycznych dla transportu aktywnego
Statistic evaluation of the kinetic constants for active transport of calcium

Grupy zwierząt	Transport maksymalny J_m	Stała wysycenia K_t
Kontrola (1)	SI	SI
Chlorfenwinfos (2)	$J_{m_1} < J_{m_2}$	$K_{t_1} < K_{t_2}$
Kontrola (1)	SI	SI
Cypermetyryna (2)	$J_{m_1} < J_{m_2}$	$K_{t_1} < K_{t_2}$
Kontrola (1)	SI	SI
Chlorfenwinfos + Cypermetyryna (2)	$J_{m_1} < J_{m_2}$	$K_{t_1} < K_{t_2}$
Chlorfenwinfos (1)	SI	SI
Cypermetyryna (2)	$J_{m_1} > J_{m_2}$	$K_{t_1} > K_{t_2}$
Chlorfenwinfos (1)	SI	SI
Chlorfenwinfos + Cypermetyryna (2)	$J_{m_1} > J_{m_2}$	NS
Cypermetyryna (1)	SI	SI
Chlorfenwinfos + Cypermetyryna (2)	NS	NS

SI – wynik istotny statystycznie przy poziomie ufności $\alpha=0.05$

NS – wynik nieistotny statystycznie przy poziomie ufności $\alpha=0.05$

Wynika z niej, że cypermetyryna podawana szczurom przez 14 dni działa na badane parametry tak jak to wykazano u zwierząt otrzymujących ten pestycyd oraz chlorfenwinfos. A więc w omawianym doświadczeniu, podobnie jak to miało miejsce w poprzednim [14], łączne podawanie pestycydów powoduje analogiczne zmiany w transporcie aktywnym wapnia do stwierdzonych dla jednego ze składników mieszanki (w tym wypadku dla cypermetyryny).

WNIOSKI

1. Chlorfenwinfos podawany szczurom per os w dawce 5% DL_{50} przez 14 dni oddziałuje na transport aktywny (zwiększa maksymalną prędkość i upośledza wiązanie wapnia z nośnikiem) i bierny (hamowanie).

2. Cypermetyryna w tych samych warunkach doświadczenia wykazuje wpływ na obydwa rodzaje transportu wapnia o takim samym kierunku jak chlorfenwinfos z tym, że wywołane przez nią zmiany w wartościach stałych opisujących transport aktywny są słabiej zaznaczone.

3. Łączne podawanie obu pestycydów charakteryzowało upośledzenie dyfuzji biernej, przy jednoczesnym braku istotnych statystycznie zmian w transporcie aktywnym.

D. Witkowska, R. Olędzka, Ł. Sędrowicz

STUDIES ON THE COMBINED EFFECT OF MIXTURES OF PESTICIDES BELONGING
IN DIFFERENT CHEMICAL GROUPS ON CALCIUM ABSORPTION IN RAT INTESTINE.
PART II. CHLORFENVINPHOS AND CYPERMETHRIN

Summary

In male Wistar rats study was made of the effect of multiple treatment (14 days) with single pesticides (chlorfenvinphos and cypermethrin) and with their mixture on intestinal calcium absorption. Pesticides were administered intragastrically through a stomach tube in a daily dose corresponding to 5% of LD₅₀; in the case of the pesticide mixture, 5% of LD₅₀ of each component were administered. Calcium uptake (active and passive) by duodenal sections were determined by the method of Papworth and Patrick, modified by the present authors.

It was found that under the applied experimental conditions chlorfenvinphos influences the active transport of calcium, causing an increase in the values of the constants J_m (maximal transport rate) and K_t (affinity of calcium to carrier), whereas it inhibits the passive transport. Similar changes were displayed by rats exposed to cypermethrin. On the other hand, combined administration of both pesticides led to a lack of changes in the efficiency of active transport and to impairment of passive transport, as compared with control.

PIŚMIENNICTWO

1. *Berridge M.*: Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 1987, 56, 159. – 2. *Clark J., Matsumura F.*: Two different types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve Ca²⁺, Mg²⁺ – ATPase activity in the squid. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1982, 18, 180. – 3. *Daly J., McNeal E., Gusovsky F.*: Cardiotonic action of pulminotoxin B, pyrethroids and their relationships with phosphatidylinositol turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 930, 470. – 4. *Garszel J., Olędzka R.*: Badania nad wpływem chlorfenwinfosu i karbarylu na metabolizm wapnia i fosforu w kościach szczurów. Część I. Badanie prowadzone in vivo. *Roczn. PZH* 1977, 28, 65. – 5. *Garszel J., Olędzka R.*: Badania nad wpływem chlorfenwinfosu i karbarylu na metabolizm wapnia i fosforu w kościach szczurów. Część II. Wyjaśnienie niektórych aspektów mechanizmów działania chlorfenwinfosu i karbarylu na metabolizm mineralny kości. *Roczn. PZH* 1978, 29, 250. – 6. *Gusovsky F.*: Regulation of phosphatidylinositol turnover in brain synaptoneurosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 1986, 83, 3003. – 7. *Olędzka R., Garszel J., Frączek B.*: Procesy rozpuszczania, wzrostu i tworzenia hydroksyapatytu pod wpływem tiuramu, propoksuru oraz mieszaniny tiuramu i chlorfenwinfosu. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1982, 15, 3. – 8. *Papworth D., Patrick G.*: The kinetics of influx of calcium and strontium into rat intestine in vitro. *J. Physiol.* 1970, 210, 999. – 9. *Rashatawar S., Matsumura F.*: Two different types of inhibitory effects of pyrethroids on nerve Ca²⁺, and Ca²⁺, Mg²⁺ – ATPase activity in the squid. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1982, 18, 180. – 10. *Schachter D., Dowdle E., Schenker A.*: Accumulation of ⁴⁵Ca by slices of the small intestine. *Am. J. Physiol.* 1960, 198, 275. – 11. *Sahib I., Prasada Rao K., Desai D.*: Pyrethroid inhibition of basal and calmodulin stimulated Ca²⁺ – ATPase and adenylate cyclase in rat brain. *J. Appl. Toxicol.* 1987, 7, 75. – 12. *Toś-Luty S., Latuszyńska J.*: Wpływ chlorfenwinfosu na rozwój embrionalny białych szczurów. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1972, 5, 331. – 13. *Toś-Luty S., Puchala W.*: Badania toksyczności chlorfenwinfosu dla zarodków kurzych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1972, 5, 339. – 14. *Witkowska D., Olędzka R., Sędrowicz Ł.*: Badanie skojarzonego działania mieszanin pestycydów z różnych grup chemicznych na wchłanianie wapnia w jelicie szczura. Część I. Dichlorfos i tiuram. *Roczn. PZH* 1991, 42, 171.

Dn. 1990.03.14

02-097 Warszawa, ul. Banacha 1