

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXV, 4

SECTIO D

1980

Zakład Chemii Toksykologicznej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Szczepaniak

Jerzy OCHYŃSKI

Wiązanie (^{14}C)-Bromfenwinfosu z białkami surowicy krwi szczura i psa

Связывание (^{14}C)-Бромфенвинфоса с белками сыворотки крови крысы и собаки

Binding of (^{14}C)-Bromfenwinfos with Rat and Dog Serum Proteins

Zastosowanie oraz znaczenie toksykologiczne związków fosforoorganicznych wśród innych grup pestycydów w ostatnim czasie stale wzrasta. Przyczyną tego są ich duże walory użytkowe, silny efekt działania oraz krótki okres trwałości. Związki te w większości są silnymi truciznami, a wprowadzone w nadmiernej ilości do środowiska stwarzają potencjalne niebezpieczeństwo zatrucia.

Przedmiotem opisanych badań był nowy insektycyd fosforoorganiczny o nazwie Bromfenwinfos (IPO-62), którego synteza została opracowana przez Instytut Przemysłu Organicznego w Warszawie (10). Substancją aktywną tego preparatu jest 2-bromo-1-(2,4-dwuchlorofenylo)-winylo-dwuetylofosforan, wykazujący wysoką aktywność owadobójczą wobec różnych bioindykatorów, zwłaszcza zaś stonki ziemniaczanej (1, 3, 7).

W przeprowadzonych badaniach nad dynamiką wchłaniania Bromfenwinfosu stwierdzono stosunkowo długi okres występowania tego związku we krwi szczura po dożołądkowej aplikacji, wskazujący na jego wiązanie się z białkami krwi (8).

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie i określenie stopnia wiązania się (^{14}C)-Bromfenwinfosu z białkami surowicy krwi szczura i psa w warunkach *in vitro* przy zastosowaniu metody dializy wyrównawczej.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

1. Surowica krwi

Do doświadczeń użyto połączoną surowicę krwi od 25 szczurów samców rasy Wistar (c.c. 180—220 g) i od 3 psów suk bezrasowych w wieku ok. 2 lat (c.c. ok. 5 kg). Krew od szczurów pobierano przez nacięcie tętnicy szyjnej, od psów z żyły jarz-

mowej. Elementy morfotyczne krwi oddzielano przez odwirowanie z szybkością 3000 obr./min. w czasie 10 min. Zawartość białka całkowitego w surowicy oznaczano metodą Lovry (8). Połączone surowice przechowywano w temp. -20°C .

2. Bromfenwinfos

Stosowano Bromfenwinfos znaczone węglem ^{14}C w ugrupowaniu winylowym o aktywności właściwej 4,39 mC/g produkcji Instytutu Chemii Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej. Według deklaracji, czystość radiochemiczna sprawdzona na drodze chromatografii cienkowarstwowej wykazała 99,8% substancji czynnej. Ze względu na trudną rozpuszczalność Bromfenwinfosu w wodzie do badań używano roztwór o stężeniu 1×10^{-4} M w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego o pH 7,4.

3. Scyntylatory

Scyntylator toluenowy zawierał w 1000 cm^3 6 g 2,5-dwufenylookszazolu (PPO) i 0,075 g 1,4-dwu-(2,5-fenylookszazolilo)-benzenu (POPOP) w stopniu czystości do scyntylacji.

Scyntylator dioksanowy zawierał w 1000 cm^3 6 g naftalenu, 4 g PPO, 0,2 g POPOP, 100 cm^3 metanolu i 20 cm^3 glikolu etylenowego w stopniu czystości do scyntylacji.

4. Dializa wyrównawcza

Zastosowano schemat układu dializacyjnego według Chojnowskiego (2). Doświadczenia polegały na inkubowaniu 7 cm^3 prób surowicy (szczura lub psa) w worku dializacyjnym zanurzonem w próbówce z 7 cm^3 buforowego roztworu Bromfenwinfosu w temp. 6°C przez 24 godz.

W celu ustalenia potrzebnego czasu trwania dializy równolegle prowadzono próby kontrolne, w których do woreczka dializacyjnego zamiast surowicy dodawano 7 cm^3 0,1 M roztworu buforu fosforanowego o pH 7,4. Stwierdzono, że już po 24 godz. następuje wyrównanie stężeń badanego insektycydu na zewnątrz i wewnątrz woreczka dializacyjnego. Po upływie tego czasu 0,5 cm^3 próbki Bromfenwinfosu w surowicy i w buforze poddawano analizie radiometrycznej. Stopień wiązania Bromfenwinfosu z białkami wyrażony w procentach względnych wyliczono zakładając, że ilość płynów w woreczku dializacyjnym i próbówce jest jednakowa i stosując następujący wzór (9):

$$S = \frac{C_{\text{wewnętrzne}} - C_{\text{zewewnętrzne}}}{C_{\text{całkowite}}} \times 100$$

gdzie: S — % związanego insektycydu;

$C_{\text{wewnętrzne}}$ — stężenie insektycydu wewnątrz woreczka dializacyjnego;

$C_{\text{zewewnętrzne}}$ — stężenie niezwiązanego insektycydu na zewnątrz woreczka dializacyjnego;

$C_{\text{całkowite}}$ — stężenie insektycydu w woreczku + stężenie insektycydu na zewnątrz woreczka dializacyjnego.

5. Pomiar radiometryczny

Zawartość ^{14}C w badanych próbkach oznaczano metodą płynnej scyntylacji. Układ liczenia składał się z urządzenia scyntylacyjnego USB-2 i przelicznika tranzystorowego PT-67a firmy Polon.

Wydajność pomiarów ^{14}C dla każdej próby obliczano na podstawie standardu

wewnętrznego, którym był ^{14}C -n-heksadekan. Współczynnik korekcyjny obliczano według Kinnory i wsp. (5). Czas pomiarów prób wynosił 5 min. Dla każdej próby wykonywano 3 oddzielne pomiary i obliczano średnią przy różnicy $\pm 3\%$. Wyniki pomiarów podawano w imp./min.

Próby $0,5\text{ cm}^3$ badanej surowicy z woreczka dializacyjnego i roztworu insektycydu w buforze, znajdującego się w probówce na zewnątrz woreczka, przenoszono do naczynek scyntylacyjnych i dodawano po 2 cm^3 roztworu NCS ($0,6\text{ N}$ roztwór wodorotlenku czwartorzędowej zasady amoniowej w toluenie). Po ostrożnym wymieszaniu wstawiano do ciepłarki o temp. 50°C na okres aż do całkowitego rozpuszczenia surowicy, a następnie zobojętniano lodowatym kwasem octowym w ilości $0,07\text{ cm}^3$ i dodawano 10 cm^3 scyntylatora toluenowego. Próby po dokładnym wymieszaniu chłodzono w lodówce i oznaczano radioaktywność. Wyniki opracowano statystycznie w postaci średniej arytmetycznej z uwzględnieniem średniego błędu średniej ($\bar{x} \pm S\bar{x}$).

6. Elektroforeza bibułowa

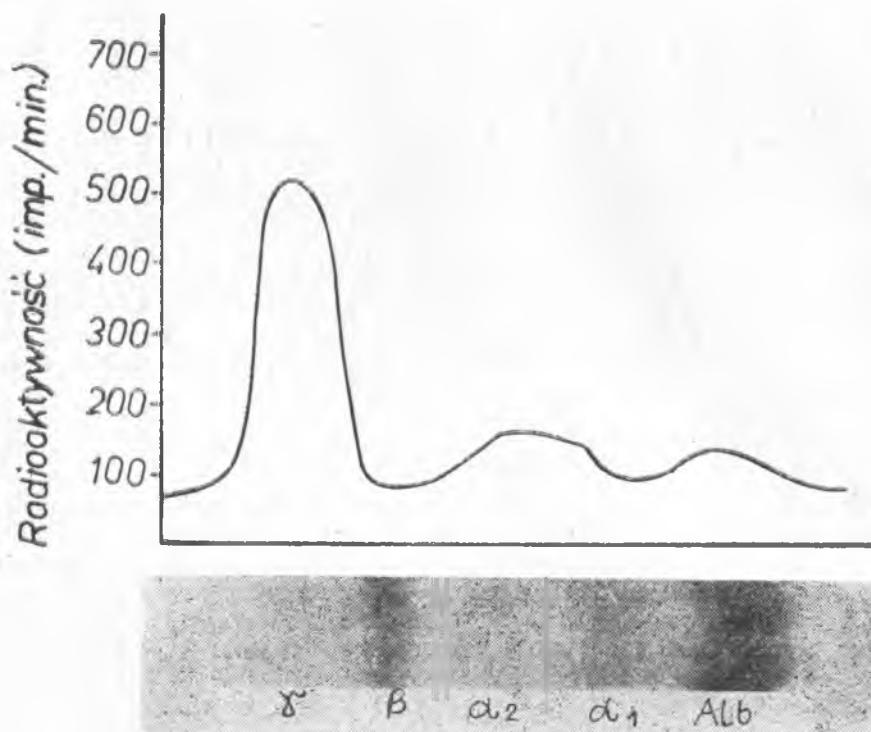
Posługiwano się aparatem do elektroforezy bibułowej produkcji Pracowni Przyrządów Fizycznych we Wrocławiu. W celu ustalenia, czy Bromfenwinfos wiąże się obok albuminy z innymi frakcjami surowicy szczurzej i psiej zastosowano, według Hutsona (4), metodę elektroforezy bibułowej w warunkach przy $\text{pH } 8,6$, opisanych przez Krawczyńskiego (6). Otrzymane elektroforegramy cięto wzdłuż i jedną połowę wybarwiano $0,02\%$ roztworem czerni amidowej przez 2 godz., a następnie zalewano kilkakrotnie odbarwiaczem (fenol + kwas octowy) do uzyskania bezbarwnych przestrzeni między frakcjami białkowymi. Drugą połowę paska cięto na 1 cm odcinki, które umieszczano w naczynkach scyntylacyjnych i dodawano 10 cm^3 scyntylatora dioksanowego. Po dokładnym wymieszaniu ochładzano w lodówce przez 3 godz., a następnie oznaczano, jak wyżej, zawartość ^{14}C .

WYNIKI BADAŃ

Stopień wiązania Bromfenwinfosu z białkami surowicy szczura i psa *in vitro* przeprowadzono metodą dializy wyrównawczej i przedstawiono w tab. 1 i 2. Wyniki wyrażono w procentach radioaktywności związanej z białkiem przy stężeniu Bromfenwinfosu $1 \times 10^{-4}\text{ M}$.

Z aktywności właściwej Bromfenwinfosu, która wynosi $4,39\text{ mC/g}$ i stężenia białka w surowicy krwi szczura i psa obliczono bezwzględną ilość pestycydu związanego z 1 g białka (tab. 3).

Ponadto przeprowadzono elektroforetyczny rozdział kompleksów białkowych z Bromfenwinfosem przy $\text{pH } 8,6$. Średnie wartości radioaktywności poszczególnych frakcji z 6 doświadczeń przeprowadzonych z inkubowaną z Bromfenwinfosem surowicą krwi szczura i psa zilustrowano na ryc. 1 i 2 łącznie z elektroforegramami.



Ryc. 1. Aktywność poszczególnych frakcji surowicy krwi szczura po 18-godzinnej elektrofrezie kompleksu surowicy z Bromfenwinfosem, łącznie z elektroforegramem wywołanym czernią amidową

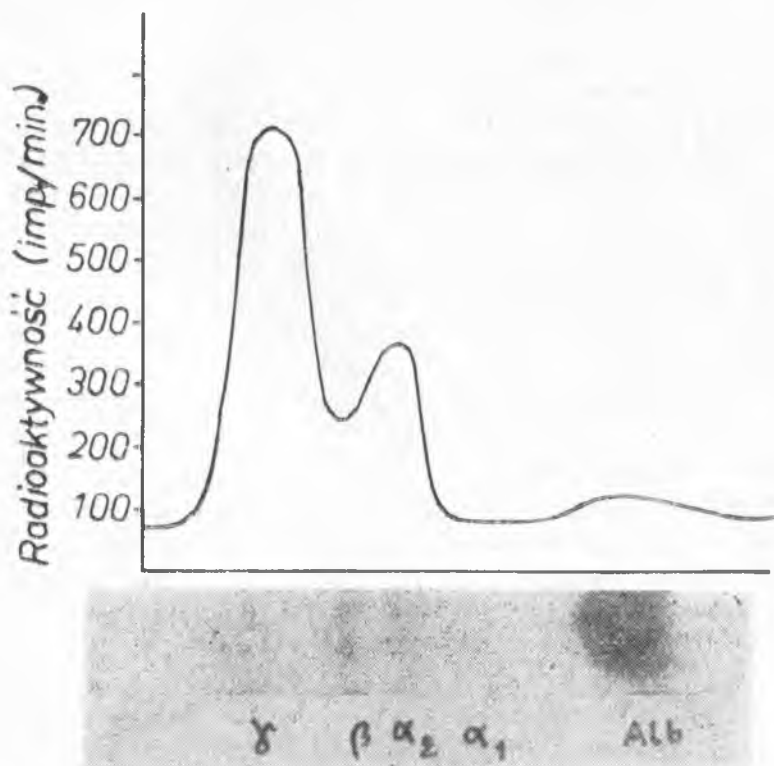
Activity of the individual fractions of the rat serum, 18 hours after the electrophoresis of the complex of the serum with Bromfenwinfos, together with the electropherogram induced by amide black

Tab. 1. Ilościowy bilans wiązania Bromfenwinfosu z białkami surowicy szczura
Quantitative balance of binding of Bromfenwinfos with rat serum proteins

L.p.	Aktywność całkowita Bromfenwinfosu w badanym układzie (C _{całkowite}) imp./min.	Aktywność niezwiązanego Bromfenwinfosu (C _{zewnetrzne}) imp./min.	Aktywność Bromfenwinfosu w surowicy (C _{wewnetrzne}) imp./min.	Radioaktywność związana z białkiem (S) %
1.	81 214	6084	75 130	85,01
2.	81 150	6254	74 896	84,58
3.	81 212	5976	75 236	85,28
4.	81 100	6152	74 948	84,82
5.	81 285	5781	75 504	85,77
6.	81 380	6295	75 085	84,52
\bar{x}	81 223	6090	75 133	84,99
S \bar{x}	±40,43	±77,73	±89,62	±0,19

Tab. 2. Ilościowy bilans wiązania Bromfenwinfosu z białkami surowicy psa
Quantitative balance of binding of Bromfenwinfos with dog serum proteins

L.p.	Aktywność całkowita Bromfenwinfosu w badanym układzie ($C_{\text{całkowite}}$) imp./min.	Aktywność niezwiązanego Bromfenwinfosu ($C_{\text{zewnetrzne}}$) imp./min.	Aktywność Bromfenwinfosu w surowicy ($C_{\text{wewnetrzne}}$) imp./min.	Radioaktywność związana z białkiem (S) %
1.	81 102	3171	77 931	92,18
2.	81 262	3021	78 241	92,56
3.	81 096	2508	78 588	93,81
4.	81 004	2230	78 774	94,40
5.	81 055	2803	78 252	93,08
6.	81 200	2907	78 293	92,83
\bar{x}	81 119	2773	78 346	93,13
$S\bar{x}$	$\pm 40,10$	$\pm 143,01$	$\pm 120,60$	$\pm 0,39$



Ryc. 2. Aktywność poszczególnych frakcji surowicy krwi psa po 18-godzinnej elektroforezie kompleksu surowicy z Bromfenwinfosem, łącznie z elektroforegramem wywołanym czernią amidową

Activity of the individual fractions of the dog serum, 18 hours after the electrophoresis of the complex of the serum with Bromfenwinfos, together with the electropherogram induced by amide black

Tab. 3. Zdolność wiązania (^{14}C)-Bromfenwinfosu (1×10^{-4} M) z białkiem szczura i psa, określona metodą dializy wyrównawczej
 Ability of binding of (^{14}C)-Bromfenwinfos with rat and dog proteins, determined by the dialysis equilibrium method

Rodzaj surowicy	Stężenie białka mg/ml	Aktywność Bromfenwinfosu na 1 ml surowicy w imp./min	Aktywność Bromfenwinfosu na 1 g białka w imp./min.	Ilość μM Bromfenwinfosu na 1 g białka
Szczura $n=6$	42,3	138 086	3 264 444	1,88
Psa $n=6$	40,3	151 246	3 753 002	2,17

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Zastosowanie metody dializy wyrównawczej pozwoliło na ilościową ocenę stopnia wiązania radioaktywnego Bromfenwinfosu z białkami surowicy krwi szczura i psa. Otrzymane wyniki wskazują, że Bromfenwinfos wiąże się z białkami surowicy w dużym stopniu, u szczura w $84,99 \pm 0,19\%$, u psa w $93,13 \pm 0,39\%$, przy czym bezwzględna ilość insektycydu związana przez 1 g białek surowicy wynosi u szczura $1,88 \mu\text{M}$, u psa $2,17 \mu\text{M}$ (tab. 1—3).

Różnice w stopniu wiązania u szczura i psa spowodowane być mogą między innymi różnicą w procentowej zawartości albuminy we krwi tych zwierząt oraz różną zdolnością wiązania Bromfenwinfosu przez inne frakcje białkowe. Rozdział elektroforetyczny kompleksów białkowych z insektycydem potwierdził, że istotnie Bromfenwinfos wiąże się w małym stopniu z albuminami, a głównie z pozostałymi frakcjami białkowymi tych różnogatunkowych surowic.

I tak w obrazie elektroforetycznym przy pH 8,6 surowicy krwi szczura, uprzednio inkubowanej z radioaktywnym Bromfenwinfossem, widoczny jest duży szczyt radioaktywności, odpowiadający γ -globulinom. Pozostała radioaktywność występuje we frakcjach α_1 - i α_2 -globulinowych i we frakcji albuminowej (ryc. 1). W surowicy psa największa część radioaktywności ujawnia się w dwóch pikach odpowiadających γ - i β -globulinom (ryc. 2). Dane piśmiennictwa (11) wskazują, że Bromfenwinfos cechuje się również dużą zdolnością wiążącą w stosunku do białek krwi ludzkiej, koziej i baraniej. Z przeglądu informacji dotyczących innych pestycydów fosforoorganicznych wynika, że Chlorfenwinfos, produkt firmy Shell, będący również enolofosforanem, wiąże się z frakcją lipoproteidową osocza krwi i to znacznie silniej u psa niż u szczura (4).

Na podstawie przedstawionych w niniejszej pracy wyników można wnioskować, że transport Bromfenwinfosu w organizmie szczura i psa za-

chodzi głównie poprzez tworzenie rozpuszczalnych kompleksów z białkami surowicy, a chwilowe zatrzymanie tego związku w krążącej krwi utrudnia jego dojście do mózgu i innych tkanek. Bezpośrednio zatrucie organizmu wywołuje ta część związku, która występuje we krwi w stanie wolnym. Należy oczekiwać, że w miarę wydalania Bromfenwinfosu z ustroju będzie następować stopniowe uwalnianie go z kompleksu białkowego. Zdolność i siła wiązania się Bromfenwinfosu z białkiem może mieć duży wpływ na rozwój i przebieg zatrucia. Może być także jednym z ważnych czynników decydujących o różnicy toksyczności tego związku dla szczura i psa (DL-50 dla szczura 63,5—83,7 mg/kg, dla psa 2730 mg/kg).

PIŚMIENNICTWO

1. Bakuniak E., Chruścielska K., Kroczyńska J., Majda A.: Roczники Nauk Roln. Seria E 2, 89—107, 1972.
2. Chojnowski W.: Acta Polon. Pharm. 27, 541—545, 1971.
3. Gwiazda M.: Badania nad mechanizmem działania nowych enolofosforanów na owady. Rozprawa habilitacyjna, Warszawa 1974.
4. Hutson D. H., Hathway D. D.: Biochem. Pharmacol. 16, 949—962, 1965.
5. Kinnory E. D. S., Konabracki E. L., Kaplan E.: Liquid Scintillation Counting. Pergamon Press, London—New York—Paris 1958.
6. Krawczyński J., Osiński T.: Laboratoryjne metody diagnostyczne. PZWL, Warszawa 1967.
7. Kroczyński J., Malinowski H.: Pestycydy nr 4, 61—71, 1972.
8. Ochyński J.: Wchłanianie i wydalanie IPO-62(¹⁴C) u szczurów. Symp. Toksykol. Pol. Tow. Farm. Poznań 1974.
9. Sterling K., Rosen Ph., Tabachnick M.: J. Clin. Invest. 41, 1021—1030, 1962.
10. Śledziński B.: Sposób wytwarzania związków o działaniu owadobójczym, zwłaszcza stonkobójczym. Biul. Urz. Pat. PRL 23, 34, 1973 (I).
11. Żelazo K.: Wiązanie pestycydów z białkami krwi. Praca doktorska, Warszawa 1976.

Otrzymano 15 XII 1979.

РЕЗЮМЕ

Исследовано связывание инсектицида Бромфенвинфоса, меченного ¹⁴C с белками сыворотки крови крысы и собаки, применяя уравнивающий диализ. Количественную оценку степени связывания проведено по радиометрическому методу, пользуясь жидкими сцинтилляторами. Было обнаружено, что Бромфенвинфос в очень значительной степени появляется в сыворотке крови крысы и собаки в виде белкового соединения, соответственно $84,99 \pm 0,19\%$ и $93,13 \pm 0,39\%$.

Путём электрофоретического разделения комплексных соединений Бромфенвинфоса с белками доказано, что исследуемый инсектицид был главным образом связан фракциями глобулина.

SUMMARY

Binding of an insecticide of Bromfenwinfos marked ^{14}C with rat and dog serum proteins was investigated by the dialysis equilibrium method. A quantitative evaluation of binding degree was performed by the radiometric method using liquid scintillators. Bromfenwinfos was found to occur, to a considerable degree, in the rat and dog sera in the form bound with proteins, $84.99 \pm 0.19\%$ and $93.13 \pm 0.39\%$, respectively. An electrophoretic separation of the protein complexes with Bromfenwinfos was performed and it was shown that the investigated insecticide was bound mainly by the globulin fractions.