

PESTICIDI I BIOHEMIZAM JETRE

M. Popović¹, K. Đaković-Švajcer², J. Nerudova³ i S. Trivić¹

Institut za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Novi Sad¹, Zavod za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Novi Sad², Institut za higijenu i epidemiologiju, Prag, ČSSR³

Primljeno 25. III. 1988.

Ispitan je uticaj pesticida lindana, binapakrila i parationa na: sadržaj citohroma P₄₅₀, glutaciona, sulf- i methemoglobina, aktivnosti lipoperoksidaze, ksantinoksidaze i transaminaza (SGOT i SPGT). Takođe je ispitivano njihovo delovanje na relativnu masu jetre i vijabilnost izolovanih hepatocita. Eksperimentalne životinje su bili pacovi rase Wistar a merenja su vršena u homogenatu jetre i izolovanim vijabilnim hepatocitima. Lindan je u homogenatu jetre i izolovanim vijabilnim hepatocitima smanjio sadržaj glutaciona i aktivnost ksantinoksidaze. Povećana je masa jetre i sadržaj citohroma P₄₅₀, dok je kod izolovanih hepatocita smanjena vijabilnost ćelija i sadržaj citohroma P₄₅₀. Binapakril je uticao na smanjenje sadržaja glutaciona i aktivnost ksantinoksidaze a povećao je aktivnost lipoperoksidaze u ogledu sa homogenatom jetre i u izolovanim hepatocitima. Takođe je povećao sadržaj citohroma P₄₅₀ i povećao smrtnost ćelija kod izolovanih hepatocita, a u *in vivo* pokusu smanjio je sadržaj citohroma P₄₅₀ i povećao masu jetre. Paration je povećao sadržaj citohroma P₄₅₀ i aktivnost lipoperoksidaze a smanjio sadržaj glutaciona u oba ogleđa. Smanjio je vijabilnost hepatocita, a povećao masu jetre. Aktivnost ksantinoksidaze je smanjio u ogledu sa izolovanim hepatocitima, a povećao u homogenatu jetre. Sva tri pesticida su smanjila sadržaj glutaciona u krvi, dok na ostale ispitivane parametre u krvi nisu bitnije uticali.

Metabolizam i uticaj pesticida binapakrila, lindana i parationa na žive organizme i pored brojnih istraživanja nije potpuno razjašnjen. Poznato je da se biotransformacija ovih pesticida vrši sa citohromom P₄₅₀, koji je terminalna oksigenaza polisupstratnih oksigenaza. Aktivnost citohroma P₄₅₀ i polisupstratne oksigenaze zavisi od vrste, pola, genetskog nasljeđa, hormonalne ravnoteže, ravnoteže ishrane i sl. (1, 2), što potvrđuju razlike u rezultatima dobivenim iz brojnih istraživanja za ove pesticide (3 – 8).

Lindan – heksaklorocikloheksan ima osam izomera, hemijski i fizički različitih osobina, od kojih je najtoksičniji γ -izomer. Oralna doza LD₅₀ lindana je za pacova

125 mg/kg T.M. Prilikom biotransformisanja lindana nastaju metaboliti koji su reaktivniji i od same polazne supstance (5).

Binapakril — [2,4-dinitro,6-(2-butil)-fenil-3,3-dimetil] akrilat inhibira oksidativnu fosforilaciju i sintezu ATP, što rezultira glikolizom i smanjenjem glikogena u jetri i mišićima. Dovodi do hipertermije i deluje na centralni nervni sistem (9). LD₅₀ za pacove je 161 ± 25 mg/kg T.M.

Paration — [o,o-dietil-o-(p-nitrofenil)]-tionofosfat spada među najznačajnije organofosforne insekticide. Toksičnost parationa je zasnovana na inhibiciji holinesteraze, katalaze, peroksidaze, lipaze i drugih esteraza (6, 10, 11). LD₅₀ za pacova iznosi 6,4 mg/kg T.M. Za inhibiciju enzima parationom odgovoran je metabolit paraokson koji nastaje biotransformacijom parationa na citohromu P₄₅₀ (7–9). Kod pacova mužjaka javljaju se i drugi toksični metaboliti: p-aminofenol i p-nitrofenol.

Cilj našeg rada je bio da se vidi uticaj binapakrila, lindana i parationa na biotransformacijske i konjugacione procese u jetri i uopšte njihovo delovanje na organizam, određivanjem nekih biohemijskih parametara u različitim biološkim model sistemima. Kao model sisteme koristili smo homogenat jetre, suspenziju vijabilnih hepatocita i krv. Ispitivani su sledeći parametri u homogenatu jetre i hepatocitima: sadržaj citohroma P₄₅₀ i glutationa, aktivnost ksantinoksidaze i lipoperoxidaze, vijabilnost hepatocita, tj. relativna masa jetre. U krvi je određivan sadržaj glutaciona sulf- i methemoglobina i aktivnost transaminaza.

MATERIJAL I METODE

Istraživanja su vršena na belim pacovima soja Wistar, polno zrelih, telesne mase od 200 do 400 g, oba pola, koji su imali slobodan pristup hrani i vodi. Svi eksperimenti u ovom radu su izvedeni u tri vrste pufera:

— Hank-1 pufer, pH 7,4; 134 mM NaCl; 0,49 mM KCl; 0,813 mM MgSO₄ × 7 H₂O; 0,337 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O; 0,441 mM KH₂PO₄; 26 mM NaHCO₃; 0,5 mM EGTA (etilenglikol bis (beta-aminoetil eter) N,N'-tetraoctena kiselina); 12,6 mM HEPES (N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina); Hank-2 pufer: 100 cm³ Hank-1 pufera sa 150 mg kolagenaze i 0,4 mM CaCl₂ × 2 H₂O.

— Krebs-bikarbonatni pufer, pH 7,4; 4,2 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 0,96 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄ × 7 H₂O; 4,2 mM CaCl₂ × H₂O; 24 mM NaHCO₃.

— TRIS . HCl pufer (TRIS-(trihidroksimetil)-aminometan), pH 7,4: 50 mM TRIS. HCl se rastvori u 250 mM saharoze koja sadrži 150 mM KCl i 10 mM MgCl₂.

Za istraživanja su korišćeni sledeći pesticidi: binapakril («Župa» — Kruševac), lindan («Zorka» — Šabac), i paration («Pliva» — Zagreb) u obliku čistih spojeva. Izolovanje suspenzije hepatocita je vršeno po metodi *Moldeusa i saradnika* (12). U vijabilne netretirane hepatocite dati su čisti spojevi pesticida u količini 1,4 × 10⁻⁴ mol/2 × 10⁶ ćelija/ml za lindan, 1,1 × 10⁻⁵ mol/2 × 10⁶ ćelija/ml za paration i 1,8 × 10⁻⁴ mol/2 × 10⁶ ćelija/ml za binapakril. Hepatociti su sa ovim pesticidima inkubirani 3 sata na 37°C i zatim su određivani navedeni biohemijski parametri (ogled *in vitro*).

Za ogled *in vivo* (homogenat jetre) pacovi su pet dana (jednokratna doza) tretirani oralno suspenzijom pesticida u fiziološkom rastvoru. Količine pesticida na kg telesne

mase su bile: $1,4 \times 10^{-3}$ mola za lindan, $1,1 \times 10^{-4}$ mola za paration i $1,8 \times 10^{-3}$ mola za binapakril. Pacovi su u toku tretmana imali slobodan pristup hrani i vodi, a kontrolne životinje su tretirane fiziološkim rastvorom. Šestog dana su životinje žrtvovane, uzeta je jetra i krv i određivani su navedeni biološki parametri. Vijabilnost hepatocita je određivana metodom sa Trypan blue. Sadržaj citohroma P_{450} meren je po metodi *Matsubare i saradnika* (13). Aktivnost ksantinoksidaze je određena metodom *Bergmeyera* (14), aktivnost lipoperoksidaze metodom *Buega i Austa* (15), sadržaj glutaciona u homogenatu jetre i izolovanim hepatocitima određivan je sa DTNB (ditiobisnitrobenzojeva kiselina) po metodi *Kapetanovića* (16), dok je sadržaj glutaciona u krvi određivan po metodi *Beutlera* (17). Procenat sulf- i methemoglobina (od ukupnog hemoglobina) je određen po metodi *Stanulovića* (18), a transaminaze po metodama *Karmena* (19) i *Wroblewski i La Due* (20), dok je sadržaj proteina meren biuret metodom modifikovanom po *Gornalu* (21). Dobiveni rezultati su obrađeni statistički Studentovim t-testom.

Sva biohemijska merenja su vršena spektrofotometrima PYE UNICAM SP 1800 i SPECOL 21 VEB, CARL ZEISS JENA u kivetama s optičkim putem od 1 cm i volumenom od 3 cm³. Vijabilnost je praćena Zeissovim binokularnim mikroskopom. Izolovanje hepatocita je vršeno miniprotočnom peristaltičkom pumpom TIP S-32 UNIPAN, Varšava. Statistička obrada je urađena na računaru DELTA 340/11.

REZULTATI

Lindan u koncentraciji od $1,4 \times 10^{-4}$ mol/ 2×10^6 ćelija/ml, posle inkubacije od 3 sata sa izolovanim vijabilnim hepatocitima je povećao sadržaj citohroma P_{450} , smanjio sadržaj glutaciona i aktivnost ksantinoksidaze, smanjio vijabilnost ćelija i nije menjao aktivnost lipoperoksidaze (rezultati su dati u tabeli 1). U tabeli 2. su prikazani rezultati dobiveni tretiranjem pacova lindanom (5 dana sa $1,4 \times 10^{-3}$ mol/kg T.M./dan). Ovde je sadržaj citohroma P_{450} smanjen kao i glutacion, smanjena je aktivnost ksantinoksidaze a povećana lipoperoksidaza i povećana je masa jetre. U krvi lindan nije menjao aktivnost transaminaza, nije povećavao procenat sulf- i methemoglobina, a smanjio je sadržaj glutaciona (tabela 2).

Binapakril u ogledu *in vitro* u količini od $1,8 \times 10^{-4}$ mol/ 2×10^6 ćelija (rezultati su dani u tabeli 1) povećao je sadržaj citohroma P_{450} i aktivnost lipoperoksidaze, jako povećao smrtnost ćelija, a smanjio sadržaj glutaciona i aktivnost ksantinoksidaze. U ogledu sa homogenatom jetre *in vivo* u količini od $1,8 \times 10^{-3}$ mol/kg T.M./dan, posle 5-dnevnog tretmana (rezultati su dani u tabeli 2) binapakril smanjuje sadržaj citohroma P_{450} i sadržaj glutaciona, kao i aktivnost ksantinoksidaze a povećava aktivnost lipoperoksidaze i masu jetre. Binapakril u krvi nije menjao aktivnost transaminaze, niti sadržaj sulf- i methemoglobina, a smanjio je sadržaj glutaciona (tabela 2).

Paration u ogledu *in vitro* (izolovani vijabilni hepatociti, tabela 1), u količini od $1,1 \times 10^{-4}$ mol/ 2×10^6 ćelija/ml, povećao je sadržaj citohroma P_{450} i aktivnost lipoperoksidaze, a smanjio sadržaj glutaciona, vijabilnost hepatocita i aktivnost ksantinoksidaze. Iz homogenata jetre pacova tretiranih parationom, 5 dana u količini od $1,1 \times 10^{-3}$ mol/kg T.M./dan (rezultati su dati u tabeli 2) dobiveni su sledeći rezultati: povećanje sadržaja citohroma P_{450} i povećanje mase jetre, smanjenje sadržaja glutaciona i povećanje aktivnos-

ti ksantinoksidaze i lipoperoksidaze. Transaminaze nisu povećane u krvi, kao ni methe-moglobin, povećan je sadržaj sulfhemoglobina i smanjio se sadržaj glutaciona (tabela 2).

Tabela 1.

Uticaj pesticida na neke biohemijske parametre izolovanih vijabilnih hepatocita nakon tročasovne inkubacije. Količina spojeva je navedena u tekstu.

Ispitivani biohemijski parametri	Kontrola	Lindan	Binapakril	Paration
Citohrom P ₄₅₀ nmol/2 · 10 ⁶ ćelija	0,29 ± 0,01	0,39 ± 0,02 ^a	0,54 ± 0,12 ^b	0,65 ± 0,06 ^d
GSH nmol/2 · 10 ⁶ ćelija	30,89 ± 4,27	21,64 ± 1,30 ^c	15,30 ± 2,31 ^d	17,94 ± 3,22 ^d
Aktivnost ksantinoksidaze nmol/2 · 10 ⁶ ćelija/min	5,42 ± 0,11	1,67 ± 0,06 ^d	2,30 ± 0,11 ^c	1,67 ± 0,19
Aktivnost lipoperoksidaze nmol/2 · 10 ⁶ ćelija/min	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,50 ± 0,18 ^a	0,35 ± 0,07
Vijabilnost % mrtvih ćelija	23,75 ± 2,50	30,00 ± 4,08 ^a	76,00 ± 8,13	68,75 ± 2,50 ^d

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD od pet uzoraka
t-test: ^a p < 0,05; ^b p < 0,02; ^c p < 0,01; ^d p < 0,001

DISKUSIJA

Uticaj pesticida lindana, bipanakra i parationa na aktivnost jetrenih enzima i kapacitet metabolisanja je u najvećem broju slučajeva ispitivan *in vivo* (3, 4, 6, 10, 11, 22, 23), mada je dosta podataka dobijeno i iz oglada *in vitro* (5, 7, 8).

Poznato je da se metabolizam lindana vrši sa citohromom P₄₅₀ (5, 24) i da su njegovi metaboliti toksični. Povećanje sadržaja citohroma P₄₅₀ u ogledu *in vitro* ukazuje da lindan ili njegovi metaboliti mogu biti induktori ovog enzima kao i polihalogenovani bifeni (1). Nepovećavanje sadržaja citohroma P₄₅₀ u ogledu *in vivo* može da bude posledica neadekvatne doze i delovanja celog organizma na transformaciju i eliminaciju. Smanjenje sadržaja glutaciona (u sva tri oglada) pokazuje da eliminacija lindana i njegovih metabolita ide većim delom preko konjugacije sa glutationom. Smanjenje aktivnosti ksantinoksidaze u oba oglada (u homogenatu jetre i izolovanim hepatocitima), a povećanje aktivnosti lipoperoksidaze *in vivo* pokazuje da se nastali radikali verovatno transformišu preko lipoperoksidaze. Povećanje lipoperoksidazne aktivnosti u uslovima smanjene koncentracije glutaciona je poznato, jer glutation ima zaštitnu ulogu u sprečavanju peroksidacije lipida (25). Lindan u datoj količini nije jako toksičan jer smrtnost ćelija je 30%.

Tabela 2.

Delovanje pesticida na neke biohemijske parametre jetre i krvi nakon petodnevnog tretmana. Količina spojeva navedena je u tekstu.

Ispitivani biohemijski parametri	Kontrola	Lindan	Binapakril	Paration
Citohrom P ₄₅₀ nmol/mg proteina	0,96 ± 0,04	0,73 ± 0,04 ^d	0,64 ± 0,07 ^d	1,04 ± 0,04 ^b
GSH nmol/mg proteina	11,53 ± 0,16	8,31 ± 0,58 ^c	8,71 ± 1,53 ^b	8,07 ± 0,59 ^c
Aktivnost lipoperoksidaze nmol/mg proteina/min	1,17 ± 0,01	3,62 ± 0,02 ^d	1,70 ± 0,06 ^d	1,67 ± 0,02 ^d
Aktivnost ksantinoksidaze nmol/mg proteina/min	1,30 ± 0,01	1,15 ± 0,06 ^a	1,05 ± 0,06 ^d	1,50 ± 0,05 ^c
Relativna masa jetre	3,73 ± 0,57	4,30 ± 0,18	4,02 ± 0,16	4,17 ± 0,14
SGOT intern. jed./dm ³ seruma	227,33 ± 44,07	209,16 ± 25,46	191,75 ± 11,35	196,50 ± 9,65
SPGT intern. jed./dm ³ seruma	43,40 ± 6,47	39,00 ± 4,16	38,00 ± 1,63	37,00 ± 3,46
GSH μmol/dm ³ eritrocita	0,96 ± 0,04	0,66 ± 0,08 ^d	0,52 ± 0,08 ^d	0,35 ± 0,04 ^d
Met Hb % od ukupnog hemoglobina	0,85 ± 0,18	0,90 ± 0,17	0,99 ± 0,17	1,06 ± 0,32
Sulf Hb % od ukupnog hemoglobina	0,96 ± 0,12	1,13 ± 0,26	1,06 ± 0,31	1,89 ± 0,22

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD od pet uzoraka
t-test: ^a p < 0,05; ^b p < 0,02; ^c p < 0,01; ^d p < 0,001

Binapakril svojim delovanjem na neke osnovne enzimatske sisteme kao što je oksidativna fosforilacija i sinteza ATP sigurno oštećuje ćeliju i remeti metabolizam (9). U ogledu *in vitro* povećava sadržaj citohroma P₄₅₀, a u ogledu *in vivo* ne, što znači da veoma slično deluje na ovaj enzimski sistem kao i lindan. Veliko povećanje aktivnosti lipoperoksidaze u našim ogledima sa binapakrilom može da se objasni prisustvom nitro-grupa koje su veoma reaktivne i čija redukcija ide preko anjon radikala (26), koji mogu da deluju kao inicijatori peroksidacije lipida. Ovaj spoj je toksičan za ćeliju jer smrtnost izolovanih hepatocita posle tri sata inkubacije iznosi 76%, što može da bude i posledica lipoperoksidazne aktivnosti, koja dovodi do oštećenja ćelijskih membrana.

Paration sadrži takođe nitro-grupu čija transformacija (kao i kod binapakrila) može da ide preko anjon radikala i da tako izazove povećanje lipoperoksidazne aktivnosti (tabela 1. i 2), dok povećanje sadržaja citohroma P₄₅₀ u oba ogleđa ukazuje na mogućnost da je paration dobar induktor citohroma P₄₅₀, jer je poznato da su većina aromatičnih jedinjenja induktori citohroma P₄₅₀, odnosno P₄₄₈ (1). Toksičnost ovog insekticida se ogleda u povećanju smrtnosti ćelija (68,7% mrtvih ćelija), što može takođe biti posledica povećane lipoperoksidazne aktivnosti (mada statistički nije značajna u ogledu *in vitro*).

Sva tri pesticida smanjuju sadržaj glutaciona u oba ogleđa (sa homogenatom jetre i hepatocitima). Ovo je najverovatnije posledica konjugacije ispitivanih pesticida sa hepatičkim glutationom i predstavlja osnovni put njihove detoksifikacije.

LITERATURA

1. *Blumberg EW*. Enzymic modification of environmental intoxicants: the role of cytochrome P₄₅₀. Quarterly Reviews of Biophysics II 1978;4:481–545.
2. *Lu HYA*. Multiplicity of Liver Drug Metabolizing Enzymes. Drug Metabolism Reviews 1979;10(2):187–208.
3. *Sieper H, Ulmann E*. Lindan, Monographie eines Insektiziden Wirkstoffes. Verlag K. Schildinger, Freiburg im Breisgau 1973.
4. IARC Monographs, Evaluation of carcinogenic risk, Some organochlorine pesticides, 5, Lion – WHO, 1974.
5. *Baker TM, Nelson MR, Van Dyke AR*. The Formation of Chlorbenzene and Benzene by the Reductive Metabolism of Lindane in Rat Liver Microsomes. Arch Biochem Biophys 1985;236:506–14.
6. *Levi EP, Hodgson E*. Oxidation of pesticides by purified cytochrome P₄₅₀ isozymes from mouse liver. Toxicology Lett 1985;24:221–8.
7. *Neal RA*. Studies on the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphothionate (parathion) in vitro. Biochem J 1967;103:183–91.
8. *Neal RA*. Studies of the enzymic mechanism of the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphothionate (parathion) by rat liver microsomes. Biochem J 1967;105:289–97.
9. *Soldatović RD, Šovljanski R, Milenković D, Milić S*. Toksikologija pesticida sa analitikom. Privredni pregled, Beograd:1980.
10. *Bradway AD, Shafik MT, Lores ME*. Comparison of Cholinesterase Activity, Residue Levels, and Urinary Metabolite Excretion of Rats Exposed to Organophosphorus Pesticides. J Agric Food Chem 1977;25:1353–8.
11. *Homman J, Schneider S, Mettbes JK*. Parathion-provoked lethality in rats is reduced by diethyldithiocarbamate. Arch Toxicol 1985;51:144–5.
12. *Moldeus P, Hogberg I, Orenius S*. Isolation and Use of Liver Cells. Methods in Enzymology Vol LII, Academic Press, New York 1978.
13. *Matsubara T, Baron J, Petersko LL, Peterson JA*. Quantitative Determination of Cytochrome P₄₅₀ in Rat Liver Homogenate. Anal Biochem 1976;75:596–605.
14. *Bergmeyer UH*. Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie Weinheim 1970.
15. *Buege AI, Aust DS*. Microsomal Lipid Peroxidation. Methods in Enzymology Vol LII, Academic Press, New York 1978.
16. *Kapetanović IM, Micyal II*. Inhibition of Acetaminophen Induces Hepatotoxicity by Phenacetin and its Alkoxy Analogs. J Pharmacol Exp Ther 1979;209:25–30.

17. Beutler E, Duron O, Kelly B. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61:882–5.
18. Stanulović M, Stanulović D. Die spektralen Eigenschaften eine Bestimmungsmethode von Sulphemoglobin. *Klinische Wochensh* 1968;46:728–9.
19. Karmen A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic–oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Investigation* 1957;34:131–3.
20. Wroblewski F, La Due SI. Serum Hepatic Disease. *Proc Soc Exper Biol and Med* 1956;91:569–71.
21. Gornall HG, Bardaval CJ. Estimation of protein in tissue homogenate. *J Biol Chem* 1949;177:751–66.
22. Šovljanski R. Prilog poznavanju toksikologije savremenih pesticida. Zbornik radova IX savetovanja o primeni pesticida u zaštiti bilja, Poreč 1978.
23. Edwards CA. Insecticide residue in Oils. *Res Rev* 1986;13:83–7.
24. Picot A. Le lindane peut-il etre remplace des produits moins toxiques. *La Recherche* 1983;14:1584–7.
25. Youns N, Albrecht N, Sigers PC. The role of iron in the NADPH dependent lipid peroxidation due to glutathione depletion by phoroze. *Pharmacol Research Commun* 1984;16:365–9.
26. Popović M, Leskovac V. The Mechanism of Nitroreduction on Liver Microsomes. Zbornik radova Prirodno-matematičkog fakulteta u N. Sadu 1979;9:395–406.

Summary

PESTICIDES AND THE BIOCHEMISTRY OF THE LIVER

The effects of various pesticides (lindane, binapacril and parathion) on the content of cytochrome P₄₅₀ and glutathione, and on the activity of lipoperoxidase, xanthine oxidase and transaminases (SGOT and SPGT) were examined. Other parameters, such as the relative liver mass and hepatocyte viability were also estimated. All the studied parameters in the liver homogenate and in hepatocytes were changed by binapacril, whereas in blood only the glutathione level was altered. Lindane produced an effect on all the parameters. In hepatocytes it did not affect only the lipoperoxidase activity. In the blood it changed only the level of glutathione content. Parathion, in the liver homogenate, changed all of the parameters examined, whereas in hepatocytes only lipoperoxidase activity remained unchanged. In the blood parathion caused a slight increase in the sulphhaemoglobin level and decreased the glutathione content.

*Institute of Chemistry, Faculty of Science and Mathematics, Novi Sad¹,
Department for Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Novi
Sad² and Institute of Hygiene and Epidemiology, Prague,
Czechoslovakia³*