

ISTRAŽIVANJE PERKUTANE TOKSIČNOSTI
ORGANOFOSFORNIH SPOJEVA
2. UČINAK POVRŠINE KONTAMINACIJE
I KONCENTRACIJE OTROVA NA BRZINU
PRODIRANJA PARAOKSONA KROZ KOŽU

M. VANDEKAR, I. KOMANOV i Đ. KOBREHEL

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

(Primljeno 31. I 1963)

Istražena je zavisnost brzine prodiranja paraoksona kroz kožu štakora u odnosu na veličinu kontaminirane površine i koncentraciju otrova. Brzina prodiranja otrova ocijenjena je na osnovu mjerenja aktivnosti kolinesteraze krvi otrovanih štakora.

Pad aktivnosti kolinesteraze bio je znatno strmiji kod štakora koji su primili istu dozu i koncentraciju paraoksona na 4 puta većoj površini, kao i kod životinja koje su primile istu dozu otrova na jednaku površinu, ali je koncentracija paraoksona bila 4 puta veća.

Pri određivanju perkutane toksičnosti srodnih spojeva prijeko je potrebno imati na umu oba ta faktora i po mogućnosti zadržati ih jednakim od spoja do spoja, kako bi se postigla stvarna komparacija njihove otrovnosti.

Podaci različitih autora o perkutanoj otrovnosti nekog određenog spoja variraju u vrlo širokim granicama (npr. 1, 2). Te su razlike mnogo veće od onih koje se navode za druge puteve aplikacije. Glavni razlog treba tražiti u nedovoljno definiranim eksperimentalnim uvjetima pri ocjeni perkutane toksičnosti.

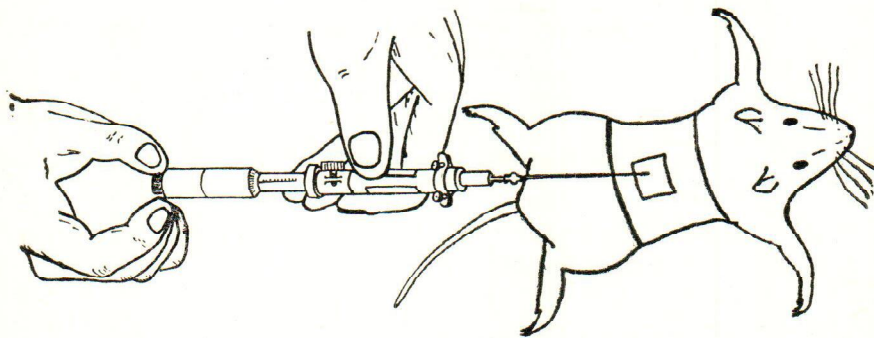
Od kojeg je značenja da li se kontaminirano mjesto na koži nakon aplikacije pokrije ili ne, demonstrirali smo pokusima na štakorima koje smo perkutano trovali parationom (3). Premda je ta razlika u načinu aplikacije otrova vjerojatno glavni razlog neslaganja rezultata američkih (1) i engleskih (2) autora, očito i ostali faktori mogu sa svoje strane utjecati na brzinu prodiranja otrova kroz kožu. Upoznavanjem svih faktora – s obzirom na tehniku rada – od kojih zavisi perkutana toksičnost nekog spoja, moći ćemo eksperimentalni postupak standardizirati i tek tada pouzdano uspoređivati perkutanu otrovnost srodnih spojeva.

U nastavku razrađivanja metode za ocjenu perkutane toksičnosti istraživali smo koliko utječe (1) površina kontaminacije i (2) koncentracija apliciranog otrova na brzinu perkutane apsorpcije paraoksona.

MATERIJAL I METODE

Paraokson (diethyl p-nitrofenil fosfat) smo dobili od G. Schradera iz Bayerovih laboratorija, Leverkusen, Zap. Njemačka. Uzorak je sadržavao 99% čiste supstancije i držan je u tami na $+4^{\circ}\text{C}$. Neposredno prije aplikacije pripremili smo prikladnu otopinu paraoksona u propilnom glikolu.

Pokuse smo vršili na muškim albino štakorima istog soja, težine 220–240 grama. Otrov smo aplicirali pomoću Agla mikroštrcaljke na kožu leđa štakora s koje smo dan prije uklonili dlaku šišanjem i skinuli masni sloj i prljavštinu pranjem (3). Površinu kontaminacije odredili smo na taj način što smo neposredno prije aplikacije na kožu leđa nalijepili leukoplast s izrezom određene kvadrature (slika 1). Otrov smo razmazali nježnim povlačenjem igle pljoštice po površini kože tik do granica izrezanog kvadrata. Životinje smo zatim smjestili u Bollmanove kaveze i pomno pratili nastup i razvijanje simptoma.



Sl. 1. – Aplikacija otrova na kožu leđa štakora. Određena kvadratura izreza na leukoplastu omogućuje razmazivanje otrova na željenu površinu

U prvoj seriji pokusa paraokson smo aplicirali štakorima u jednakoj dozi (1,43 mg/kg) i koncentraciji (20 mg/ml) razmazujući otrov na dvije različito velike površine: $2 \times 2\text{ cm}$ i $4 \times 4\text{ cm}$. U drugoj seriji pokusa aplicirali smo na istu površinu ($2 \times 2\text{ cm}$) jednaku dozu otrova (1,43 mg/kg), ali smo pri tom upotrijebili dvije različite koncentracije paraoksona: 20,0 i 80,0 mg/ml. Svaka grupa sadržavala je 6 životinja.

Da dobijemo što bolji uvid u brzinu prodiranja otrova kroz kožu, svim smo štakorima dan prije kanilirali jugularnu venu. Uzorke krvi

(0,15 ml) uzimali smo u određenim vremenskim razmacima iz kani-
lirane vene (4) i zatim mjerili aktivnost kolinesteraze pune krvi na
na Warburgovu respirometru (5). Enzimsku hidrolizu acetilkolina
(0,0138 M) pratili smo pri 37° C 60 minuta. Očitavanja smo vršili sva-
kih 10 minuta. Iz registriranih razlika u tlaku izračunali smo brzinu
evolucije ugljičnog dioksida metodom kao što su je opisali *Aldridge*,
Berry i *Davies* (6). Aktivnost kolinesteraze krvi otrovanih životinja
izrazili smo kao postotke srednjih vrijednosti normalnih aktivnost dvaju
uzoraka krvi što smo ih uzeli životinji prije same aplikacije otrova. Na
taj način svaki je štakor sam sebi poslužio kao kontrola.

REZULTATI

Razlike u brzini prodiranja otrova kroz kožu, s obzirom na dvije
različite površine kontaminacije (4 cm² i 16 cm²) i dvije različite kon-
centracije (20 mg/ml i 80 mg/ml), mogli smo uočiti već i na temelju
brzine nastupa simptoma odnosno registracijom broja uginulih živo-
tinja (tablica 1)

Tablica 1

*Nastup simptoma kod štakora kojima je jednaka doza (1,43 mg/kg) i koncentracija
otrova (20,0 mg/ml) aplicirana na dvije različite površine
(u minutama nakon aplikacije otrova)*

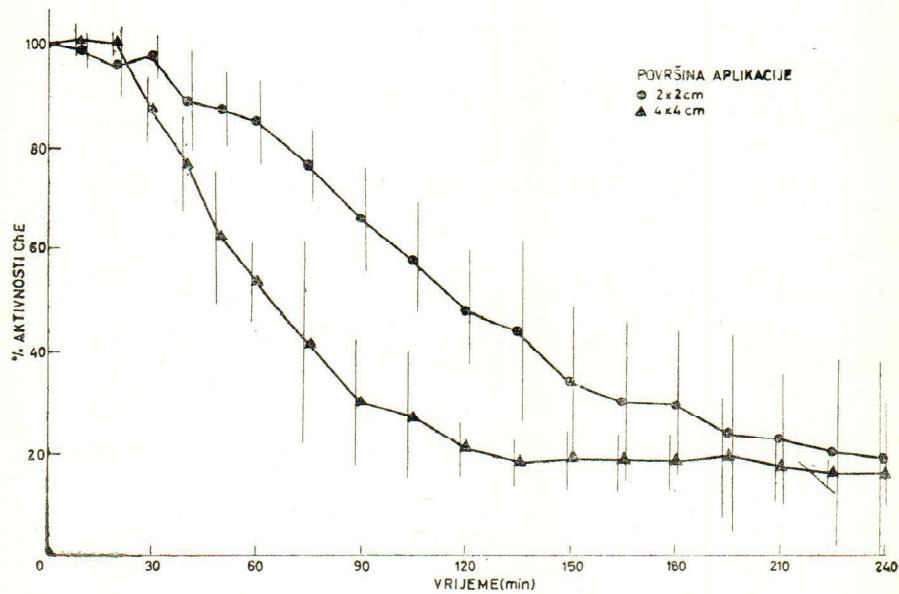
Simptomi	$\bar{X} \pm SE$		Diferen- cija	SE _{dif}	t	P
	Površina konta- minacije (cm ²)					
	4	16				
Izolirane fascikulacije	42,5 (± 5,38)	19,2 (± 1,58)	23,3	5,61	4,171	< 0,01
Generalizirane fascikulacije	64,2 (± 8,85)	44,0 (± 12,30)	20,2	15,77	1,281	> 0,05
Tremor	127,3 (12,16)	62,5 (12,16)	54,8	44,01	1,245	> 0,05
Dispnea	127,5 (21,23)	69,0 (12,61)	68,5	24,69	2,774	< 0,05
Broj uginulih/ broj otrovanih	1/6	1/6				

\bar{X} = aritmetička sredina

SE = standardna pogreška aritmetičke sredine

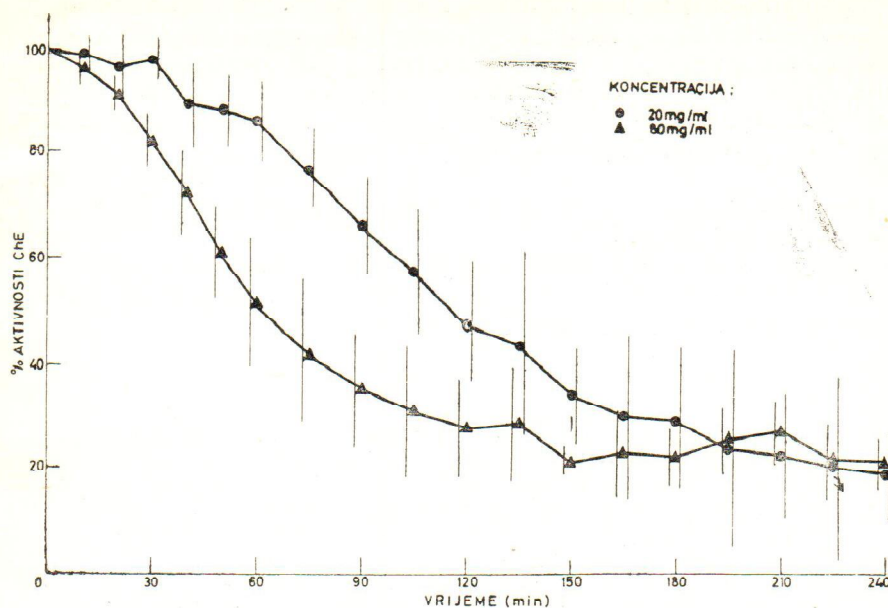
Tako su životinje kojima je aplicirana ista doza i koncentracija otrova na 4 puta većoj površini ispoljile simptome znatno brže i broj uginulih životinja bio je znatno veći. Slične smo razlike zamijetili na životinjama koje su primile istu dozu otrova na istoj površini, ali kad je koncentracija otrova bila 4 puta veća.

Pravu ocjenu brzine prodiranja paraoksiona kroz kožu stekli smo na osnovu određivanja aktivnosti kolinesteraze krvi otrovanih štakora. Rezultati tih određivanja prikazani su na slikama 2 i 3.



Sl. 2. – Inhibicija kolinesteraze krvi štakora nakon perkutane aplikacije paraoksiona. Jednaka doza (1,43 mg/kg) i koncentracija (20,0 mg/kg) otrova razmazana je na dvije različite površine: 4 i 16 cm². Svaka tačka predstavlja srednju vrijednost dobivenu na 6 životinja sa 95%o-granicama pouzdanosti

Paraokson apliciran u jednakoj dozi i koncentraciji, ali na četiri puta veću površinu, izazvao je u toku prva dva sata znatno brži pad aktivnosti kolinesteraze (Sl. 2). Isto tako je pad aktivnosti kolinesteraze krvi bio znatno brži kod životinja kojima smo jednaku dozu paraoksiona aplicirali na istu površinu, ali u 4 puta većoj koncentraciji. Obje razlike bile su statistički značajne.



Sl. 3. – Inhibicija kolinesteraze krvi štakora nakon perkutane aplikacije paraoksiona. Jednaka doza otrova (1,43 mg/kg) razmazana je na jednaku površinu (4 cm²); primijenjene su dvije različite koncentracije paraoksiona: 20,0 i 80,0 mg/ml. Svaka tačka predstavlja srednju vrijednost dobivenu na 6 životinja sa 95%-granicama pouzdanosti

DISKUSIJA

Općenito je poznato da učinak iste doze otrova zavisi od koncentracije u kojoj ga primjenjujemo. U pravilu je kod većih koncentracija resorpcija otrova brža, ali i tu postoje izuzeci (7). Sam karakter otapala također uvjetuje brzinu resorpcije. *Deichmann* (8) je u pokusima na kunićima s parationom i njegovim dimetilnim analogom našao razlike u brzini resorpcije kroz kožu i alimentarni trakt, kad je otrov primijenio u različitim medijima.

Naši su pokusi pokazali da je brzina prodiranja paraoksiona kroz kožu zavisna od koncentracije u kojoj se otrov primjenjuje: povećanjem koncentracije povećava se i brzina prodiranja.

Faktor površine aplikacije otrova specifičan je za ocjenu perkutane toksičnosti. Iz naših se pokusa vidi da je brzina prodiranja paraoksiona kroz kožu – a time i njegova otrovnost (vidi tablicu 1) – bila znatno povećana rasprostire li se paraokson iste doze i koncentracije na četvo-rostruku površinu.

Vjerojatno su i ta dva faktora – koncentracija i površina aplikacije – pored već istraženog učinka pokrivanja tretirane površine (3) – razlog velikim neslaganjima različitih autora pri ocjeni perkutane toksičnosti istih spojeva. Pri standardizaciji metode treba uzeti u obzir i spomenuta dva faktora, kako bismo mogli ispravno ocijeniti i među sobom usporediti perkutanu otrovnost istraženih spojeva.

Ova istraživanja vršena su uz dopunsko financiranje Savjeta za naučni rad NR Hrvatske.

Tehničkom suradniku Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada T. Fajdetiću, koji je vrlo vješto vršio operativne zahvate, zahvaljujemo na vrijednoj suradnji i pomoći.

Literatura

1. *Gaines, T. B.*: Toxicol. Appl. Pharmacol., 2 (1960) 88.
2. *Edson, F. F.*: Pharmac. J., (1960) 361.
3. *Vandekar, M. i Komanov, I.*: Arh. hig. rada, 14 (1963).
4. *Vandekar, M. i Fajdetić, T.*: Arh. hig. rada, 13 (1962).
5. *Aldridge, W. N.*: Biochem. J., 46 (1950) 451.
6. *Aldridge, W. N., Berry, W. K. i Davies, D. R.*: Nature, 164 (1949) 925.
7. *Moore, P. F., Yim, C. K. W. i Miya, T. S.*: Fed. Proc., 19 (1960) 390.
8. *Deichmann, W. B., Pugliese, W. i Cassidy, J.*: A. M. A. Arch. Indust. Hyg., 5 (1952) 44.

STUDY OF DERMAL TOXICITY OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS. II. EFFECT OF THE SIZE OF THE CONTAMINATED SKIN AREA AND THE CONCENTRATION OF THE POISON ON THE PENETRATION RATE OF PARAOXON THROUGH THE SKIN

The relation between the penetration rate of paraoxon through the rat's skin and the size of the contaminated area on the one hand, and the concentration of the poison on the other, have been investigated. The penetration rate was estimated on the basis of the measurements of the blood cholinesterase activity of the poisoned rats.

The fall in cholinesterase activity was considerably more rapid when the same dose and the same concentration of paraoxon were applied to a skin area four times larger, as well as in the rats given the same dose to the same skin area but when the applied concentration of paraoxon was four times higher.

When determining the dermal toxicity of related compounds it is important to keep these two factors – the contaminated skin area and the concentration of the poison – as constant as possible, in order to attain a reliable basis for comparing their toxicity.

*Institute for Medical Research,
incorporating the Institute
of Industrial Hygiene, Zagreb*

*Received for publication
January 31, 1963*