

TOKSIKOLOGIJA DIELDRINA I. OCJENA I STUDIJ AKUTNE TOKSIČNOSTI

M. VANDEKAR*

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

(Primljeno 10. II 1962)

Određena je peroralna, intraperitonealna i intravenozna LD₅₀ vrijednost za dieldrin na bijelim štakorima. Istražen je utjecaj gladovanja u odnosu na brzinu javljanja simptoma nakon peroralne aplikacije dieldrina. Određena je ukupna tolerirana doza otrova pri različitim brzinama intravenozne infuzije dieldrina štakorima.

Dobiveni rezultati su prodiskutirani, a napose s obzirom na pojavu »zakašnjelih« simptoma nakon jednokratne aplikacije otrova.

Dieldrin (1 : 2 : 3 : 4 : 10 : 10–heksakloro–6 : 7–epoksi–1 : 4 : 4a : 5 : 6 : 7 : 8 : 8a–oktahidro–1 : 4–endo–5 : 8–eksodimetanonaftalen) je insekticid iz grupe kloriranih ugljikovodika i zajedno s aldrinom, klordanom, izodrinom, endrinom, heptaklorom i toksafenom čini grupu tzv. visokokloriranih cikličnih ugljikovodika. Spektar njegova insekticidnog djelovanja je izvanredno širok, a pored toga, ima izrazito rezidualno djelovanje koje se može uporediti s onim što ga ima DDT. Zbog tih svojstava dieldrin se danas sve više koristi u poljoprivredi i javnom zdravstvu, a napose za suzbijanje insekata koji su razvili rezistenciju prema DDT. Peroralna otrovnost dieldrina oko tri puta je veća od otrovnosti DDT, a što je – s obzirom na profesionalnu ekspoziciju – još važnije, dieldrin za razliku od DDT lagano prolazi kroz kožu, i to ne samo u otopljenom stanju već i u krutom obliku (6).

Zbog navedenih toksičnih osobina, dieldrin predstavlja veliku opasnost za zdravlje ljudi koji ga primjenjuju, ako se iz bilo kojeg razloga ne pridržavaju propisanih zaštitnih mjera. Poznati su brojni slučajevi pojave epileptičkih grčeva kod ljudi koji su radili s dieldrinom, i pri nekim je akcijama učestalost otrovanja među eksponiranim radnicima iznosila 10–20% (1). Opisan je i veći broj smrtnih profesionalnih otrovanja (2,4). Zanimljivo je da dieldrin može izazvati epileptičke grčeve kod ljudi i nekoliko mjeseci nakon prestanka ekspozicije. Premda je

* Dio ovih istraživanja autor je vršio u Toksikološkoj istraživačkoj jedinici Britanskog Savjeta za medicinska istraživanja u Carshaltonu, Surrey, Engleska.

klinička slika otrovanja prilično dobro opisana, sam mehanizam djelovanja dieldrina u organizmu potpuno je nepoznat. Nedavno su objavljeni preliminarni rezultati koji se odnose na distribuciju i izlučivanje dieldrina kod miša (3) i štakora (7, 8) otrovanih dieldrinom.

Naša istraživanja na području toksikologije dieldrina vršimo s krajnjim ciljem da – u okviru naših mogućnosti – pridoneseo boljem razumijevanju mehanizma djelovanja dieldrina. U prvoj fazi naših pokusa izvršili smo ocjenu akutne toksičnosti dieldrina na bijelim štakorima, upoređivanje peroralne akutne toksičnosti dieldrina kod normalno hranjenih životinja s onom kod štakora izvrnutih 24-satnom gladovanju i istraživanje učinka dieldrina apliciranog štakorima sporom intravenoznom infuzijom. Ta smo istraživanja vršili naročito u odnosu na pojavu »zakašnjelih« simptoma, koji su zapaženi kod ljudi otrovanih dieldrinom.

MATERIJAL I METODE

Dieldrin smo dobili od Shellova istraživačkog centra, Sittingbourne, Kent, Vel. Britanija. Tačka tališta bila mu je nakon dvokratne rekristalizacije iz alkohola pri 175,5° C.

Za peroralnu aplikaciju pripremili smo otopinu dieldrina (40,0 mg/ml) u arahisovu ulju, a za intravenoznu odnosno intraperitonealnu aplikaciju pripremili smo određenu koncentraciju dieldrina u glicerolfomalu.

Kao eksperimentalne životinje upotrijebili smo muške i ženske albino štakore.

LD₅₀ vrijednosti sa 95% granicama pouzdanosti izračunali smo metodom pomičnih srednjih vrijednosti, koju su opisali *Thompson* (5) i *Weil* (9). Vrijeme promatranja životinja trajalo je do izostanka i najmanjih znakova otrovanja, a najmanje 4 tjedna nakon aplikacije otrova. U tom vremenskom razmaku, pored simptoma, registrirali smo u određenim intervalima tjelesnu težinu životinja. Životinje su primale standardnu dijetu za laboratorijske štakore nabavljenu od »Vetseruma«, Zagreb.

Intravenoznu infuziju dieldrina vršili smo na muškim bijelim štakorima (240–260 g) kojima smo u eter-narkozi uveli politensku kanilu u venu jugularis. Slobodni kraj kanile provukli smo potkožno do nuhalne regije, i na tom mjestu probili kožu i proveli kanilu napolje. Pri uvođenju u jugularnu venu kanila je bila ispunjena 0,1% otopinom heparina u fiziološkoj otopini. Operativni zahvat u pravilu nije trajao duže od 15 minuta, i životinje su se brzo oporavljale od narkoze, tako da su se 1 sat nakon operacije ponašale potpuno normalno. Jedan sat nakon operacije smjestili smo životinju u mali kavez koji joj je omogućio slobodno uzimanje hrane i vode, ali je sprečavao okretanje. Slobodni kraj kanile spojili smo s infuzionim aparatom tvrtke »Palmer«.

Brzinu unošenja dieldrina u cirkulaciju varirali smo mijenjajući brzinu infuzije ili koncentraciju dieldrina u otopini. Za vrijeme infuzije pratili smo i vremenski registrirali razvitak simptoma i nastup egzzitusa, a zatim iz vremena trajanja infuzije, brzine injiciranja i koncentracije dieldrina izračunali ukupnu toleriranu dozu na 1 kg životinje.

Istim smo načinom injicirali dvije grupe po 10 muških štakora određenom količinom dieldrina (30,0 odnosno 40,0 mg/kg). Brzina infuzije dieldrina kod tih pokusa iznosila je oko 3,33 mg/kg/sat i zavisila je samo od tjelesne težine štakora, koja je varirala od 240–260 g. U momentu kad su štakori primili naprijed navedenu ukupnu količinu otrova (trajanje infuzije iznosilo je oko 9, odnosno 12 sati), infuzija je prekinuta, i dalja 4 tjedna pratili smo simptome i ponašanje otrovanih životinja.

REZULTATI

Određivanje akutne toksičnosti dieldrina

Određena je peroralna, intraperitonealna i intravenozna otrovnost dieldrina na bijelim štakorima. Rezultati tih pokusa sumirani su na tablici 1.

Tablica 1

Akutna toksičnost dieldrina za bijele štakore. LD₅₀ vrijednosti izračunane na bazi ugibanja životinja u periodu od 4 tjedna nakon aplikacije otrova

Put aplikacije otrova	Spol	Dob	LD ₅₀ (mg/kg)	95% granice pouzdanosti (mg/kg)
peroralni	ženke	3–4 mj.	48,5	36,4–64,6
	mužjaci	3 mj.	63,5	54,3–74,2
intraperitonealni	ženke	3 mj.	55,9	47,9–65,3
intravenozni	ženke	4–5 tjed.	8,4	7,9– 8,9
	ženke	3 mj.	8,9	7,6–10,3

Bez obzira na put aplikacije, simptomi izazvani dieldrinom bili su izraženi u ekscitaciji centralnog nervnog sistema i uključivali su trzaje grupa mišića koji su bivali sve češći i zahvaćali sve veće područje, dok se najposlije nije razvio tipičan epileptički napadaj s kloničko-toničkim grčevima i kraćom ili dužom depresijom. U težim slučajevima depresija je prelazila u komu. U pravilu, životinje su ugibale u toku jednog epileptičkog napadaja.

Nakon intravenozne injekcije dieldrina epileptički napadaji ponavljali su se svakih nekoliko minuta i životinje su obično ugibale pri 4–6. napadaju. Štakori koji su primili doze otrova u blizini LD₅₀ vrijednosti ugibali su u roku od 40 minuta, a oni koji bi preživjeli taj period, oporavljali su se relativno brzo. Ni kod jedne preživjele životinje otrovane intravenoznom injekcijom nisu zapaženi »zakašnjeli« simptomi, a niti promjene čudi i ponašanja.

Nakon intraperitonealne i peroralne aplikacije, simptomi otrovanja razvijali su se mnogo sporije i trajali nekoliko dana. Životinje su gubile na tjelesnoj težini (napose prva 3–4 dana nakon injekcije otrova), a ugibale bi u roku od 14 dana nakon aplikacije otrova, prilikom jednog od »zakašnjelih« epileptičkih napadaja. Pored toga, kod životinja koje su primile veće doze dieldrina bilo peroralno ili intraperitonealno, javila se razdražljivost obično 2–3 dana nakon aplikacije otrova, koja je trajala do ugibanja životinje, ili bi kod preživjelih štakora za 2–3 tjedna postepeno iščezla. Tablice 2 i 3 prikazuju ukupan broj uginulih životinja na jednoj dozi otrova registriran u određeno vrijeme opservacije.

Tablica 2

Ukupan broj uginulih životinja nakon jednokratne intraperitonealne aplikacije dieldrina nakon određenog vremena. 12 ženskih štakora injicirano je na jednoj dozi otrova

Doza (mg/kg)	Vrijeme nakon injiciranja (dani)					
	0,25	1	2	7	14	28
30,0	0	0	0	0	0	0
42,4	0	0	0	1	1	1
60,0	0	1	1	8	9	9
84,8	1	1	1	10	10	10
Ukupno	1	2	2	19	20	20

Tablica 3

Ukupan broj uginulih životinja nakon jednokratne peroralne aplikacije dieldrina nakon određenog vremena. 21 ženska štakora injicirana su na jednoj dozi otrova

Doza (mg/kg)	Vrijeme nakon injiciranja (dani)					
	0,25	1	2	7	14	28
20	1	1	1	2	3	3
40	9	9	9	13	13	13
80	10	11	11	15	15	15
160	12	12	13	21	21	21
Ukupno	32	33	34	51	52	52

Upoređivanje akutne toksičnosti dieldrina kod normalno hranjenih životinja s onom kod štakora izvrnutih 24-satnom gladovanju

Kod ženskih štakora izvrnutih 24-satnom gladovanju javljali su se simptomi nakon peroralne aplikacije dieldrina mnogo kasnije nego kod normalno hranjenih životinja. Statističku značajnost tih razlika izrazili smo t-testom (tablica 4).

Tablica 4

Nastup grčeva kod ženskih štakora izvrnutih 24-satnom gladovanju i kod normalno hranjenih životinja (u minutama nakon aplikacije otrova)

Doza (mg/kg)	$\bar{X} \pm SE$		Diferen- cija	SE _{dif.}	t	P
	24h gla- dovanje	normalna ishrana				
20	59,1 ($\pm 3,90$)	41,8 ($\pm 2,62$)	17,3	4,51	3,836	< 0,01
40	55,6 ($\pm 3,64$)	40,1 ($\pm 2,68$)	15,5	4,18	3,708	< 0,01
80	72,5 ($\pm 11,2$)	41,8 ($\pm 3,16$)	30,7	11,66	2,633	< 0,05
160	53,1 ($\pm 2,58$)	38,2 ($\pm 1,96$)	14,9	3,21	4,642	< 0,01
20-160	60,4 ($\pm 3,39$)	40,5 ($\pm 1,26$)	19,9	3,75	5,307	$\ll 0,01$

\bar{X} = aritmetička sredina

SE = standardna pogreška aritmetičke sredine

Ovu razliku u javljanju simptoma nakon peroralne aplikacije dieldrina mogli smo potvrditi ponavljanim pokusom samo na ženskim štakorima, dok isti pokusi vršeni na muškim štakorima nisu pokazali značajnih razlika u brzini javljanja simptoma između hranjenih životinja i životinja izvrnutih 24-satnom gladovanju.

Uporedimo li odnos uginulih prema injiciranim ženskim štakorima nakon peroralne aplikacije dieldrina hranjenim životinjama s istim odnosom kod štakora izvrnutih gladovanju (tablica 5), vidimo da su u prvim danima pokusa hranjene životinje ugibale brže od životinja izvrnutih 24-satnom gladovanju.

Tablica 5
Učinak peroralne aplikacije dieldrina na štakorima (a) hranjenim normalno i (b) izvirgnutim 24-satnom gladovanju. Ženski štakori 200–250 g

Doza (mg/kg)	Broj uginulih / broj injiciranih nakon						
	0.25	1	2	7	14	28	
	d a n a						
(a)	20	1/12	1/12	1/12	1/12	1/12	1/12
	40	7/12	7/12	7/12	7/12	7/12	7/12
	80	6/12	6/12	6/12	7/12	7/12	7/12
	160	7/12	7/12	7/12	11/12	11/12	11/12
(b)	20	0/12	0/12	0/12	1/12	2/12	2/12
	40	2/12	2/12	2/12	6/12	6/12	6/12
	80	4/12	5/12	5/12	8/12	8/12	8/12
	160	5/12	5/12	6/12	10/12	10/12	10/12

Uporedimo li, međutim, LD₅₀ vrijednosti izračunane na osnovu ugi-
banja nakon 2 tjedna opservacije (tj. nakon vremenskog perioda kad
životinje više nisu ugibale) one se među sobom ne razlikuju (tablica 6).

Tablica 6
14-dnevne LD₅₀ vrijednosti nakon peroralne aplikacije dieldrina muškim i ženskim
štakorima

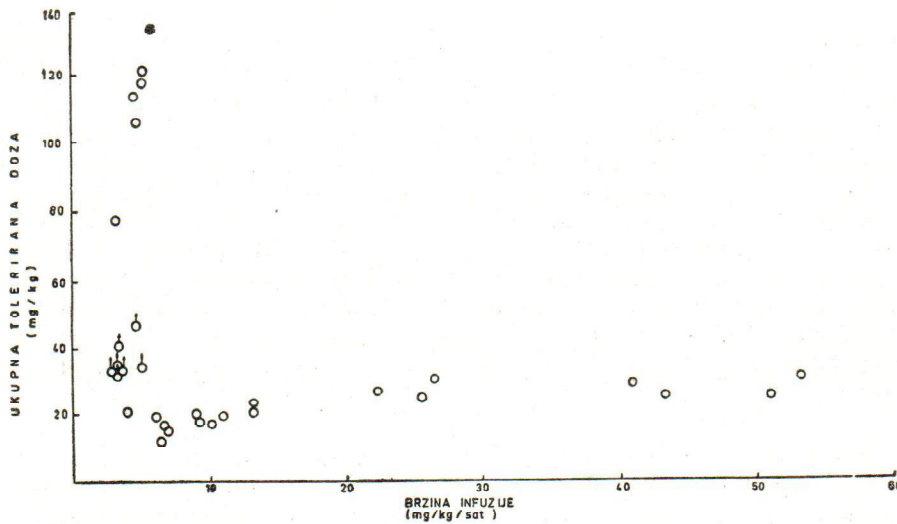
Spol	Stanje ishrane	LD ₅₀ (mg/kg)	95% granice pouzdanosti (mg/kg)
ženke	hranjene	47,4	30,8–73,3
	24 sata bez hrane	49,2	34,2–70,8
mužjaci	hranjeni	63,5	50,4–80,0
	24 sata bez hrane	63,5	50,4–80,0

*Istraživanje učinka dieldrina apliciranog štakorima sporom intrave-
noznom infuzijom*

S ciljem da odredimo zavisnost ukupne tolerirane doze otrova od
brzine ulaska otrova u organizam, vršili smo pokuse spore intravenozne
infuzije dieldrina na muškim štakorima.

Svi infundirani štakori razvili su tipične znakove ekscitacije central-
nog nervnog sistema (trzaje mišića i epileptičke napadaje), a vrijeme

nastupa simptoma zavisilo je od brzine ulaska otrova u cirkulaciju. Smanjenje brzine infuzije ispod 5,2 mg/kg/sat bilo je praćeno izrazitim povećanjem ukupne doze toleriranog otrova (slika 1). Štakori izvrgnuti većim brzinama infuzije tolerirali su oko 2 i. v. LD₅₀ vrijednosti, dok su životinje injicirane brzinama manjim od 5,2 mg/kg/sat tolerirale do 14 i. v. LD₅₀ vrijednosti.



Sl. 1 - Toleriranje dieldrina pri različitim brzinama infuzije otrova u venu jugularis muškim štakorima (240-260 g.) o = uginula životinja; ♂ = preživjela životinja (infuzija prekinuta)

U drugoj seriji pokusa aplicirali smo kod dvije grupe po 10 muških štakora sporom intravenoznom infuzijom dieldrin u ukupnoj dozi od 30,0 odnosno 40,0 mg/kg s ciljem da utvrdimo da li će i ovi štakori, poput štakora otrovanih peroralno ili intraperitonealno, razviti »zakašnjele« simptome i promjene u ponašanju, premda je otrov uveden u organizam intravenozno.

Svih 10 štakora koji su primili 30 mg/kg dieldrina, preživjeli su 4-tjedni opservacioni period, i u sve to vrijeme bili su razdražljivi i agresivni, tako da ih se nije moglo vaditi iz kaveza niti uz zaštitne rukavice. Razdražljivost se obično javila 2-3 dana nakon infuzije. Od 10 štakora koji su primili ukupnu dozu dieldrina od 40 mg/kg samo 2 su preživjela period promatranja od 4 tjedna. Jedan štakor je uginuo za vrijeme infuzije, tri su uginula drugi dan pokusa, dva treći, jedan četvrti, a jedan jedanaesti dan pokusa. Svi štakori koji su preživjeli više od dva

dana razvili su vrlo jaku agresivnost i razdražljivost, koja je trajala sve dok su uginuli, odnosno do kraja vremena opservacije od 4 tjedna. Kod većine štakora zapaženi su u toku opservacionog perioda »zakašnjeli« epileptički napadaji.

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Relativno visoke LD_{50} vrijednosti kao i vrijeme nastupa simptoma nakon peroralne i intraperitonealne aplikacije dieldrina štakorima ukazuju na sporu resorpciju otrova iz crijeva odnosno peritonealne šupljine. S druge strane, podaci o vremenu ugibanja životinja nakon tih puteva aplikacije govore za dugotrajnu postojanost otrova u organizmu, odnosno perzistenciju stvorene lezije dieldrinom. Nakon peroralne odnosno intraperitonealne aplikacije mogli smo registrirati »zakašnjele« epileptičke grčeve koji su se javljali 2–3 pa i više dana nakon aplikacije otrova. Vrlo je vjerojatno da je upravo zbog tih zakašnijelih simptoma broj uginulih životinja porastao od 2 na 19 nakon intraperitonealne aplikacije, odnosno od 34 na 51 nakon peroralne aplikacije u toku trećeg do sedmog dana otrovanja. Nakon intravenozne aplikacije dieldrina životinje su ugibale relativno brzo, a one koje su preživjele relativno brzo su se opravljale.

Nisu nađene značajne razlike u otrovnosti dieldrina s obzirom na dob i spol štakora. Bez obzira na put aplikacije, dieldrin je izazvao kod svih životinja tipične znakove ekscitacije centralnog nervnog sistema, koji su pri većim dozama otrova prešli u tipične epileptičke napadaje.

Jedino pri peroralnoj aplikaciji ženskim štakorima brzina nastupa simptoma je zavisila od stanja ishrane životinje, tj. normalno hranjene životinje razvile su grčeve u prosjeku nakon 40 minuta, dok su životinje izvrgnute 24-satnom gladovanju ispoljile prve simptome tek nakon 60 minuta. Zanimljivo je da na muškim štakorima nismo mogli naći razlike u vremenu nastupa simptoma, premda smo pokus izvršili na identičan način kao na ženjkama. Nađene razlike kod ženskih štakora vjerojatno treba tumačiti različitim brzinama prolaza (pasaže) sadržaja želuca i crijeva pri različitim uvjetima ishrane. Pored tog tumačenja moguća su i druga, i u našim daljim istraživanjima pokušat ćemo naći odgovor na to pitanje.

Naglo povećanje ukupne doze toleriranog otrova pri brzinama intravenozne infuzije nižim od 5,2 mg/kg/sat (slika 1) može se tumačiti u prvom redu time što se distribucija dieldrina u organizmu štakora pri tim manjim brzinama ulaska u cirkulaciju znatno razlikuje od one pri brznoj intravenoznoj aplikaciji. Budući da je brzina razgradnje i izlučivanja dieldrina, čini se, vrlo spora – za to govore i rezultati naših preliminarnih pokusa s označenim spojem (7, 8) – faktor distribucije diel-

drina u organizmu smatramo presudnim za toleriranje ukupne količine otrova.

Životinje koje su primile sporom intravenoznom infuzijom velike doze otrova (40,0 mg/kg) također su pokazale u daljem toku opservacije »zakašnjele« epileptičke grčeve. Prema tome, nije put aplikacije već ukupna injicirana doza faktor od kojeg zavisi pojava »zakašnjelih« simptoma. Kao i kod preživjelih životinja otrovanih dieldrinom peroralno odnosno intraperitonealno, registrirali smo kod štakora koji su sporom intravenoznom infuzijom primili 30 odnosno 40 mg/kg dieldrina razdražljivost i agresivnost životinja. Tu zanimljivu pojavu u ponašanju životinja koje su primile relativno visoku dozu otrova, a koja perzistira i nekoliko tjedana nakon aplikacije otrova, namjeravamo dalje istraživati.

Za razliku od peroralne i intraperitonealne aplikacije, gdje brzina ulaska dieldrina u cirkulaciju kao ni ukupna resorbirana količina dieldrina ne može biti definirana, pokusi spore intravenozne infuzije omogućili su nam da štakorima injiciramo relativno visoke doze otrova pod kontroliranim uvjetima i da na tako otrovanoj životinji pratimo njegovo djelovanje. Taj način aplikacije služiti će nam, pored ostalog, u studiju metabolizma dieldrina označenim Cl^{36} -dieldrinom.

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

Na vrijednoj tehničkoj suradnji i pomoći zahvaljujem J. Hetheringtonu, tehničkom suradniku Toksikološke istraživačke jedinice u Charshaltonu i T. Fajdetiću, tehničkom suradniku Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Literatura

1. Hayes, W. J. Jr.: Publ. Hlth. Rep., 72 (1957) 1087.
2. Hayes, W. J. Jr.: Bull. Wld. Hlth. Org., 20 (1959) 891.
3. Heath, D. F.: in »Radioisotopes and Radiation in Entomology«. Proceedings of a Symposium, Bombay, 1960, str. 83.
4. Patel, T. B., Rao, V. N.: Brit. Med. J., 1 (1958) 919.
5. Thompson, W. R.: Bact. Rev., 11 (1947) 115.
6. United States Department of Health, Education and Welfare, Communicable Disease Center: Clinical memoranda on economic poisons, Savannah, Ga., 1956.
7. Vandekar, M.: II kongresni sastanak jugosl. fiziologa, Beograd, 1961. Rezime naučnih saopštenja, str. 157.
8. Vandekar, M.: Expert Committee on Insecticides (Toxic Hazards of Pesticides to Man), Zeneva, 1961, Working Paper No. 9. 5.
9. Weil, C. S.: Biometrics, 8 (1952) 249.

Summary

TOXICOLOGY OF DIELDRIN I. STUDIES OF ACUTE TOXICITY

The peroral, intraperitoneal and intravenous LD₅₀ values of dieldrin are determined in albino rats. The effect of starving in relation to the time of the onset of symptoms after peroral application of dieldrin is studied. The total tolerated dose of dieldrin at various intravenous infusion rates is determined.

The results obtained are discussed, particularly with regard to the appearance of »delayed« symptoms after a single application of the poison.

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

*Received for publication
March 5, 1962*