

Arh. hig. rada 9 (1958) 11

## FAKTORI KOJI UVJETUJU VARIJABILNOST REZULTATA PRI OCJENI AKUTNE TOKSIČNOSTI

B. SVETLIČIĆ i M. VANDEKAR

*Zavod za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu i Institut  
za medicinska istraživanja Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti, Zagreb*

*(Primljeno 20. IV. 1958.)*

U uvodu je raspravljeno značenje novosintetiziranih supstancija s obzirom na njihovu toksičnost i opasnost po zdravlje za ljude i domaće životinje. Analizirajući korištenje eksperimentalnih podataka o toksičnosti, autori ističu, da je primjena tih podataka na ljude i domaće životinje moguća tek onda, kad dobro poznajemo mehanizam djelovanja istraživane supstancije.

Izneseni su faktori, koji uvjetuju varijabilnost rezultata pri ocjeni akutne toksičnosti, s naročitim osvrtom na određivanje toksičnosti organofosfornih spojeva. Autori temelje svoja izlaganja na podacima drugih autora i na vlastitim zapažanjima. Faktore, od kojih zavisi varijabilnost rezultata, autori dijele na one, koji se odnose (1) na istraživanu supstanciju, (2) na pokusnu životinju i (3) na put unošenja otrova.

Od faktora, koji se odnose na istraživanu supstanciju, autori ističu nedovoljnu čistoću spoja i razgradnju uzorka u toku njegova pripremanja ili pohranjivanja. S obzirom na pokusnu životinju prodiskutiran je utjecaj vrste, dobi, spola i genetskih faktora, kao i utjecaj faktora, od kojih zavisi kondicija eksperimentalne životinje. Naročito je istaknuto od kojeg je značenja za konačan ishod rezultata postupak s tretiranim životinjama u toku opservacije simptoma. Zbog različite brzine apsorpcije put unošenja često uvjetuje vrlo velike razlike u toksičnosti nekog spoja. I medij, u kojem se istraživana supstancija primjenjuje, može znatno utjecati na brzinu apsorpcije otrova.

Autori zaključuju, da eksperimentalni podaci o akutnoj toksičnosti nekog spoja imaju svoju punu vrijednost tek onda, kad uz osnovne statističke karakteristike sadržavaju i sve podatke o eksperimentalnim uvjetima, koji mogu biti od značenja u vezi s istraživanom supstancijom, putem unošenja i pokusnom životinjom.

## UVOD

Kemijska industrija danomice stavlja u promet nove proizvode namijenjene različitim granama industrije ili širokoj potrošnji. Mogućnost akutnog ili kroničnog djelovanja neke novosintetizirane supstancije može, prema tome, biti od značenja ne samo za radnike u industriji već i za ostalo stanovništvo i domaće životinje. Radi zaštite zdravlja treba utvrditi, kolika je najviša dopuštena količina neke supstancije, kojoj organizam smije biti bez opasnosti izložen u više ili manje određenom vremenskom razdoblju. Odluke o dopuštenoj ekspoziciji u industriji mogu se donositi na temelju već postojećih iskustava i na temelju promatranja eksponiranih radnika. Kad takvih iskustava nema, treba eksperimentalnim radovima na životinjama nastojati, da se dobije što bolja slika o toksičnosti novih proizvoda. Svrha je takvih istraživanja da se utvrdi, kolika je potencijalna opasnost industrijskog otrova ili novog komercijalnog proizvoda za zdravlje ljudi i životinja.

U vezi s primjenom neke otrovne supstancije valja lučiti dva pojma: (1) njezinu osnovnu toksičnost i (2) opasnost, koju ta supstancija predstavlja za zdravlje u toku svoje primjene. Pod toksičnošću razumije se *spособnost* supstancije da izazove štetni učinak na živom organizmu, dok se pod opasnošću za zdravlje misli na *vjerojatnost*, da će do takvog djelovanja doći u normalnim uvjetima primjene. Tako se na primjer mnoga vrlo toksična insekticidna sredstva, kao na primjer cijanidi, primjenjuju s relativno malo opasnosti, jer se koriste na ograničenom području i uz naročite mjere opreza. S druge strane, niz kudikamo manje otrovnih insekticida (Dieldrin, HCH i dr.), koji se primjenjuju na širokoj osnovi, izazvali su otrovanja kod ljudi i životinja zbog nedovoljnih mjera opreza.

Premda se pokusom na životinjama ne može postići apsolutni dokaz o neškodljivosti, odnosno o stupnju toksičnosti neke supstancije za čovjeka, očito je, da se takvi eksperimenti moraju provesti. S tim u vezi postavlja se pitanje, do koje se granice mogu rezultati dobiveni na životinjama primijeniti na ljude. U kasnijem izlaganju posebno ćemo se osvrnuti na znatne razlike u osjetljivosti pojedinih vrsta pokusnih životinja na određene otrove. Zbog razlika u reakciji pojedinih sisavaca na isti otrov eksperimentalni podaci o toksičnosti ne mogu se primijeniti sa željenom sigurnošću na ljude, dokle god ne znamo, na koji način istraživana supstancija djeluje u organizmu životinje i od kakvog je značenja zahvaćeni metabolički sistem za čovjeka. Ocjena toksičnosti može se temeljiti samo na dobrom poznavanju sudbine otrova u organizmu. U toku istraživanja otrovnosti valja dakle nastojati, da se biokemijskim i fiziološkim metodama upozna način ulaska otrova u organizam, njegova raspodjela, mehanizam djelovanja i putovi, kojima se otrov izlučuje iz organizma.

Pod akutnom toksičnošću razumije se učinak, što ga u organizmu izazove jednokratno ili ponavljano unošenje neke supstancije u vreme-

nu od 24 sata (15). S obzirom na to, što su pritom osnovni podaci broj uginulih odnosno preživjelih životinja, određivanje akutne toksičnosti, svrstava se u tzv. kvantalne testove, u kojima očekujemo odgovor »sve ili ništa« (18). Akutna se toksičnost može međutim mjeriti i graduiranim reakcijama, na pr. registracijom trajanja života, odnosno intenziteta, ili trajanja određenih simptoma nakon jednokratne doze ili u toku kontinuirane ekspozicije otrovu.

Danas se nastoji podatke o toksičnosti izraziti na kvantitativnoj osnovi. Starija literatura često navodi samo »letalnu dozu« (LD) ili »minimalne letalne doze« (MLD), pri čemu se misli na smrtnu ili najmanje doze, od kojih ugiba ograničen broj životinja. Uzimanjem u pokus većeg broja životinja, izjednačenih po težini i spolu za svaku apliciranu dozu otrova, moguće je preciznije odrediti dozu, od koje ugiba 50% životinja ( $LD_{50}$ ). Te se vrijednosti mogu dalje ocijeniti različitim statističkim metodama. Pri određivanju akutne toksičnosti nije dovoljno samo registrirati preživjele odnosno uginule životinje i na osnovu toga dati statističku obradu rezultata, već valja u isto vrijeme promatrati tip, nastup, lokalizaciju i trajanje svih promjena i simptoma. Pažljivim promatranjem manjeg broja pokusnih životinja često se postižu vredniji rezultati nego neracionalnim uništavanjem velikog broja životinja, koje smo u mogućnosti tek površno promatrati. Razumljivo je, s druge strane, da nedovoljan broj životinja u eksperimentu umanjuje točnost dobivenih rezultata. Iskustvo eksperimentatora omogućit će u takvom slučaju kompromis, t. j. da sa što manjim utroškom pokusnih životinja postigne što točnije rezultate.

Podaci različitih autora o toksičnosti nekog spoja često pokazuju i znatnih razlika, o čemu se možemo lako uvjeriti, ispodredimo li podatke objavljene u pojedinim priručnicima. Tako su i pri određivanju akutne toksičnosti organofosfornih spojeva pojedini autori dobili vrijednosti  $LD_{50}$ , koje su među sobom veoma razlikuju. Tablica 1 ilustrira razlike u 50%-letalnim dozama za Parathion.

U ovom prikazu dat ćemo pregled osnovnih faktora, koji utječu na rezultate pri određivanju akutne toksičnosti neke supstancije. Primjeri,

Tablica 1

*Akutna peroralna toksičnost Parathiona za muške štakore  
Rezultati različitih autora*

$LD_{50}$ (mg/kg)	Autor
7,5	Wilhelmi i Domenjoz (21)
11,0	Klimmer i Pfaff (13)
13,4 (10,6–16,9)	Svetličić i Vandekar (17)
15,0	DuBois <i>et al.</i> (8)
30,0 ( $\pm 3,6$ )	Frawley <i>et al.</i> (9)

kojima potkrepljujemo naša izlaganja, odnose se uglavnom na toksikologiju organofosfornih insekticida i oni počivaju na vlastitim opažanjima, a dijelom su prikupljeni i iz literature s tog područja.

Faktore, koji uvjetuju varijabilnost rezultata pri ocjeni akutne toksičnosti, možemo svrstati u one, koji se odnose (1) na istraživanu supstanciju, (2) na pokusnu životinju i (3) na put unošenja otrova.

## 1. ISTRAŽIVANA SUPSTANCIJA

### 1.1 *Kemijski sastav i fizikalna svojstva*

Nema sumnje, da je pri proučavanju toksičnosti neke supstancije potrebno raspolagati sa što više podataka s obzirom na njezina fizikalna i kemijska svojstva. Od koristi su podaci o talištu, vrelištu, topljivosti, hlapljivosti, specifičnoj težini i drugim fizikalnim karakteristikama te supstancije. Dobro poznavanje kemijskog sastava, uključivši i poznavanje eventualnih onečišćenja, odnosno primjesa, u velikoj mjeri olakšava eksperimentatoru rješavanje postavljenog zadatka.

Toksičnost relativno jednostavnih anorganskih spojeva osniva se u većini slučajeva na djelovanju jednog elementa, i njihov se učinak može u pravilu predvidjeti isporođivanjem s drugim sličnim spojevima. Posve drugačije ponašaju se organski spojevi; tu i neznatne strukturne razlike (stereoizomerija, položaj u homolognom redu i sl.) mogu uzrokovati kvantitativno i kvalitativno veoma različite biološke učinke. Premda se danas nastoji sve više tumačiti biološko djelovanje spojeva na bazi njihove kemijske strukture, još uvijek se u većini slučajeva samim poznavanjem strukturne formule novo sintetiziranog spoja ne može ni izdaleka predvidjeti mehanizam njegova biološkog djelovanja.

Podaci o postojanosti supstancija na zraku, svjetlu, toplini, zatim u vodenim otopinama različitog pH od velike su vrijednosti. Radi li se o nepostojanom spoju, može se lako doći do pogrešnih zaključaka o njegovoj aktivnosti, ako se toj činjenici ne pridaje dovoljno pažnje. (Vidi kasnije.)

### 1.2 *Primjese i onečišćenja*

Toksična svojstva nekog spoja istražuju se u većini slučajeva na uzorku bez primjesa. Budući da je apsolutna čistoća uzorka u praksi rijetka, treba nastojati da količina primjesa ne bude tolika, da bi one sa svoje strane mogle izazvati biološko djelovanje.

Priroda i količina bilo kakvog onečišćenja zavisi od proizvodnog procesa i od sastava izvornih sirovina. Zbog toga će čistoća uzorka u svakom industrijskom pogonu biti drugačija. Za rješavanje neposrednog problema, kao što je na primjer testiranje otrovnosti nekog međuprodukta ili konačnog produkta, najbolje je upotrebiti originalni uzorak.

U takvom slučaju ne uklanjamo onečišćenja iz uzorka, jer upravo ona mogu biti od industrijsko-higijenskog značenja s obzirom na ekspoziciju radnika ili potrošača. Pritom se u pravilu nastoji postići tek gruba ocjena toksičnosti, a rezultati će biti važni samo za određeni specifični problem.

Za osnovna biološka istraživanja treba imati supstancije što veće čistoće i pročišćavanje uzorka često je najteža faza u toku određivanja toksikoloških svojstava nekog spoja (10). Biologa ne će uvijek zadovoljiti čistoća istraživanog spoja, premda ga organski kemičar ili sintetičar nazivaju »čistim«. Radi li se naime o primjesama minimalnih količina biološki vrlo aktivne supstancije, njezini će se tragovi manifestirati kod bioloških pokusa, premda se kemijskom analizom ne mogu dokazati.

Kao što smo već istaknuli, u podacima o toksičnosti organofosfornih spojeva nerijetko nalazimo vrlo divergentne rezultate o akutnoj toksičnosti jednog te istog spoja (tablica 1). Glavni razlog tome su onečišćenja toksičnijim primjesama u većem ili manjem opsegu (14). Tako će tragovi tetraetil pirofosfata, prisutni u kojem drugom manje otrovnom dietilfosfatnom esteru, zbog svoje jake aktivnosti utjecati na toksičnost ispitivanog estera. Prva istraživanja aktivnosti Parathiona *in vitro* i *in vivo* dala su pogrešne rezultate zbog prisutnosti malih količina dvaju mnogo aktivnijih tiolskih izomera Parathiona, a vjerojatno i Paraoxona (1). Danas znamo, da se Parathion ponaša *in vitro* kao slabi inhibitor kolinesteraze i da se u organizmu razgrađuje u mnogo aktivniji inhibitor – Paraoxon. Kod relativno slabih (indirektnih) inhibitora pročišćavanje uzorka je neobično važno, jer će i najmanji tragovi aktivnih primjesa izmijeniti njihovu toksičnost i sliku otrovanja. Takvo pročišćavanje je katkada teško provesti, jer se radi o srodnim spojevima, često veoma sličnih fizikalnih i kemijskih svojstava.

Prednosti rada sa pročišćenim supstancijama su očite: smanjuje se varijabilnost s obzirom na porijeklo uzorka, rezultati su precizniji, a njima se mogu poslužiti i drugi autori.

### 1.3 Promjene istraživane supstancije prije aplikacije

Postojanost istraživane supstancije prema zraku, svjetlu, hidrolizi i sl. – napose pri specifičnim okolnostima uvjetovanima samim eksperimentom – važan je faktor, koji se ne smije zanemariti. Očigledno je, da može doći do pogrešne interpretacije rezultata, desi li se bilo kakva kemijska promjena uzorka u razdoblju od pripremanja prikladnog oblika za aplikaciju do časa primjene. Taj je problem naročito čest kod testova kronične toksičnosti, premda može biti od velikog značenja i kod kratkotrajnih pokusa. Pripremanje uzorka za primjenu može izazvati ili pospješiti razgradnju otrova i dovesti do promjena u izvornoj toksičnosti.

Općenito se smatra, da poliranje otrovnih supstancija kroz dulje vrijeme – ako se radi o nestabilnim spojevima – dovodi do smanjivanja

njihove izvorne toksičnosti, zbog postepene razgradnje otrova u manje aktivne razgradne produkte. Premda se to dešava i kod organofosfornih spojeva, pokazalo se, da pohranjivanje nekih od tih spojeva kroz više mjeseci na sobnoj temperaturi dovodi do povećanja njihove prvotne otrovnosti. Ta je pojava opisana kod izomera *Metasystoxa* i njima srodnih spojeva (10). Tablica 2 pokazuje promjenu toksičnosti, koja se desila za vrijeme pohranjivanja tih spojeva na sobnoj temperaturi. Uz promjenu otrovnosti mijenja se i vrsta, brzina nastupa i trajanje simptoma nakon jednokratne aplikacije (20).

Tablica 2

*Intravenozna toksičnost za štakore nekih organofosfornih spojeva, svježe pročišćenih (I) i nakon pohranjivanja kroz više mjeseci na sobnoj temperaturi (II) - (20)*

Spoj	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	
	I	II
00-dimetil S-etiltioetil fosforotionat	216,2 (♀) (—)	37,8 (♀) (32,4-44,0)
00-dimetil S-etiltioetil fosforotiolat	64,6 (♀) (54,4-76,8)	1,18 (♀) (1,05-1,34)
00-dimetil S-etilsulfonil-etil fosforotiolat	47,2 (♂) (—)	2,0 (♂) (1,6-2,5)

Nedavno je opaženo povećanje toksičnosti i kod duljeg pohranjivanja Diazinona na sobnoj temperaturi (4a).

Prema tome eksperimentator se ne će zadovoljiti samo činjenicom da je spoj bio pripremljen u dovoljno čistom stanju, već mora biti siguran, da od vremena njegova testiranja, odnosno pročišćavanja, do dana određivanja njegove biološke aktivnosti nije došlo do razgradnje istraživanog spoja.

Kako bismo rezultate ocjenjivanja toksičnosti nekog spoja ili komercijalnog proizvoda mogli kasnije isporučiti s novoprodučenim preparatom, treba sačuvati dio prvotnog uzorka. Kod supstancija osjetljivih na kisik i na svjetlo, ili inače nestabilnih pri normalnim atmosferskim uvjetima, takvo isporučivanje ima manje značenje. U pravilu treba nerazrijeđene uzorke pohraniti na niskoj temperaturi i u tami.

Između mnogih reakcija, koje se mogu desiti bilo u toku pohranjivanja ili pripremanja organofosfornog spoja za aplikaciju, navest ćemo najznačajnije.

*1.3.1 Hidroliza.* Među organofosfornim spojevima ima veoma stabilnih u vodi, s polovičnim vremenom razgradnje do 100 godina (Schradan), ali i vrlo nestabilnih, s polovičnim vremenom od nekoliko sati

(tetraetilpirofosfat), pa čak i minuta (neki derivati Dimefoxa). U pravilu, spojevi, koji su vrlo aktivni kao inhibitori kolinesteraze, vrlo su nestabilni (2). Brzina hidrolize zavisi u velikoj mjeri i od pH pripremljene otopine. Poznato je, da se većina organofosfornih spojeva brzo hidrolizira u alkaličnim otopinama.

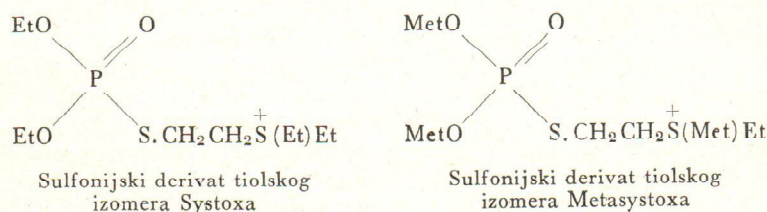
Ima slučajeva, kada zbog izrazite nestabilnosti nekog spoja u vodi treba upotrebiti koje drugo otapalo ili injicirati istraživanu supstanciju nerazrijeđenu pomoću mikro-brizgalice. Ako se ne radi o ekstremnim slučajevima, vodenu otopinu treba pripremiti neposredno prije aplikacije.

*1.3.2 Oksidacija.* Spojeve, koji lako oksidiraju, treba aplicirati što brže, uz što manje mučkanje i u hladnom stanju. Treba ih pohranjivati u tami, na hladnom, a po potrebi u atmosferi dušika ili u vakuumu.

*1.3.3 Izomerizacija.* Pojava izomerizacije kod tiofosfatnih estera nije rijetka. Poznato je, da tionofosfati prelaze u tiolske izomere: takva se izomerizacija odvija kod Systoxa pri povišenoj temperaturi, odnosno kod Metasystoxa na sobnoj temperaturi u polarnim otapalima (11).

Budući da su tiolski izomeri znatno toksičniji od tiono izomera, to je pri određivanju toksičnosti tiono spojeva važno spriječiti proces izomerizacije.

*1.3.4 Autoalkiliranje.* Nedavno je opisana pojava spontanog autoalkiliranja kod izomera Systoxa i Metasystoxa. Rezultat autoetiliranja kod Systoxa, odnosno autometiliranja kod Metasystoxa je stvaranje vrlo aktivnih inhibitora kolinesteraze ionskog karaktera, s pozitivnim nabojem na alkiliranom sumporu (10):



U polarnom mediju kod Metasystoxa paralelno s izomerizacijom tiono-izomera u tiolski teče veoma brzi proces autometiliranja i praktički onemogućuje aplikaciju spoja u vodenom ili kojem drugom polarnom mediju (20).

## 2. POKUSNA ŽIVOTINJA

### 2.1 Ursta životinje

Činjenica je, da pojedine životinjske vrste veoma različito reagiraju na određene toksične agense. Ta razlika u osjetljivosti tek je jedna od brojnih bioloških karakteristika, po kojima se neka vrsta razlikuje od

Tablica 3

*Intravenozna toksičnost fluoroacetata i di-izopropil fluorofosfonata za neke sisavce*

Životinja	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	
	Fluoracetat (6)	Di-izopropil fluorofosfonat (12)
kunić	0,25	0,34 (±0,01)
mačka	0,20	1,63 (±0,03)
pas	0,06	3,43 (±0,62)
majmun	4 (Rhesus) 15 (Spider)	0,25 — 0,30

druge. Ipak su još uvijek mnogo bolje poznate anatomske i fiziološke razlike između pojedinih životinjskih vrsta, nego što su poznate razlike u načinu njihova reagiranja na pojedini otrov. Te se razlike mogu uočiti na tablici 3, na kojoj su kao primjer iznesene vrijednosti LD<sub>50</sub> za različite sisavce, dobivene nakon intravenozne aplikacije fluoroacetata (6) i di-izopropil fluorofosfanata (12).

Kako bismo podatke o toksičnosti mogli barem približno primijeniti na čovjeka ili korisne domaće životinje, istraživanu supstanciju treba testirati najmanje na tri vrste sisavaca (15). Općenito se uzima da je na djelovanje otrova čovjek oko šest puta osjetljiviji od psa, a oko deset puta osjetljiviji od štakora. Najčešće se u pokus uzima albino miš, štakor ili zamorče, a na temelju iskustava stečenih na ovim relativno jeftinim životinjama, odabiremo jednog od viših sisavaca, t. j. mačku, psa, svinju, ovcu ili drugu životinju. Od odabranih triju vrsta pokusnih životinja jedna mora biti iz grupe, koja ne pripada glodavcima.

Odabire se vrsta, za koju znamo, ili pretpostavljamo, da na određene kemijske supstancije reagira što sličnije čovjeku, odnosno domaćoj životinji (5). Mačke su, na primjer, prikladne za testiranje spojeva koji izazivaju methemoglobinemiju. Pri istraživanju demijelinizacijskih učinaka, što ih izazivaju neki organofosforni spojevi, kokoši reagiraju sličnije čovjeku nego bilo koja druga životinjska vrsta. Ponekad je izbor vrste vezan i za količine biološkog materijala, koji se želi upotrebiti za istraživanja. Drugi puta, opet, statistička obrada zahtijeva veći broj životinja, pa smo prinuđeni posegnuti za manjim, odnosno jeftinijim pokusnim životinjama. Prema tome, očito je, da izbor vrste zavisi i od metodike samog eksperimenta.

## 2.2 Spol

Osjetljivost testiranih životinja na određene toksične agense u odnosu na spol varira od neznatnih do veoma izrazitih razlika. Te su razlike zapažene naročito kod štakora, a manje kod ostalih pokusnih životinja.



Tako su, na primjer, ženke štakora osjetljivije na Parathion od mužjaka, a obrnut je slučaj u osjetljivosti prema Schradanu. Ta se pojava tumači različitom sposobnošću konverzije prvotnog spoja u aktivni inhibitor (1). Tablica 4 prikazuje razlike u osjetljivosti muških i ženskih štakora na neke organofosforne spojeve.

Tablica 4

*Akutna peroralna toksičnost nekih organofosfornih spojeva za muške i ženske štakore*

Spoj	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	
	Mušjaci	Ženke
Parathion (9) (dietil <i>p</i> -nitrofenil tiofosfat)	30,0 (±3,6)	3,0 (±0,25)
OMPA (9) (oktametil pirofosforoamid)	13,5 (±0,34)	35,5 (±3,4)
Systox (19) ( <i>oo</i> -dietil <i>S</i> -etiltioetil fosforotioat)	6,2	2,5
Diazinon (19) ( <i>oo</i> -dietil 0-/2-izopropil-4-metil-piramidil (6) / tiofosfat)	108,0	76,0
EPN (9) (etil <i>p</i> -nitrofenil tionobenzen fosfonat)	91,0 (±8,2)	14,5 (±1,6)

Pri određivanju toksičnosti nekog novog spoja poželjno je testirati supstanciju na oba spola, a napose kada se otrovnost određuje na štakorima. Kod rada sa ženkama treba nastojati, da se u pokus ne potkradu gravidne životinje, koje mogu posve drugačije reagirati.

### 2.3 Dob životinje

Razumljivo je, da suviše mlade ili prestare životinje mogu dati nepouzdan rezultate. Budući da se rast, a i kondicija životinja – uz ostale opće karakteristike – odražava u težini, to pri odabiranju životinja za određeni pokus nastojimo, da nam razlike ne budu veće od 10% tjelesne težine. U načelu treba težiti, da životinje budu što više izjednačene.

### 2.4 Genetički faktori

Darwin je prvi istaknuo, koliko je domestikacija životinja pridonijela stvaranju mnoštva različitih sojeva, dok su divlje populacije ostale uglavnom jedinstvene. Isto tako postoje varijacije s obzirom na osjetljivost prema otrovima unutar pojedinih sojeva laboratorijskih životi-

nja. Vjerojatno ima pojava individualne osjetljivosti i u samom leglu, ali one ne će biti od značenja, naročito kad rezultate primjenjujemo na druge životinje ili na čovjeka.

### 2.5 Kondicija i ostali faktori

Kondicija životinje odraz je niza faktora, od kojih u velikoj mjeri zavise rezultati pokusa. Na kondiciju utječe način ishrane (s obzirom na kvalitetu i kvantitetu hrane), zatim držanje i smještaj, broj životinja u pojedinom kavezu i klimatski faktori.

*Anna M. Baetjer* i *R. Smith* (3) su pokazali svojim pokusima, od kojeg je značenja temperatura okoline na reagiranje životinja otrovanih Parathionom. Grupa miševa držanih na 35,5° C pokazala je nakon intraperitonealne, odnosno intravenozne injekcije otrova brži nastup simptoma, veću brzinu ugibanja, veći broj uginulih i brži oporavak preživjelih, nego što je to bilo pri 22° C. Na temperaturi od 15,6° C simptomi su se pojavili kasnije, povećao se broj protrahiranih ugibanja, pa je s tim u vzzi i letalitet bio veći nego kod 22° C. Kod naših pokusa s Parathionom na miševima (17) zapazili smo za vrijeme vrućih ljetnih mjeseci sličan učinak okolinske temperature, kao što su ga opisali *Baetjerova* i *Smith*.

I prevelik broj životinja u kavezu može utjecati na konačni ishod rezultata. Taj je faktor od velikog značenja i u pokusima s inhibitorima kolinesteraze zbog uzajamno provociranih simptoma otrovanih životinja. Isto tako i ostali načini uznemirivanja testirane životinje mogu uzrokovati manifestaciju novih ili pojačanje već prisutnih simptoma. Tako će diranje životinje ili zvučni podražaj jačeg intenziteta kod životinja otrovanih organofosfornim spojevima izazvati napadaje tremora ili grčeva u fazi razvitka simptoma kao i u fazi njihova nestajanja. Kod kritičnih doza otrova, t. j. kod doza u blizini  $LD_{50}$  vrijednosti, na taj način provocirani tremor i grčevi mogu pospješiti ili pače uzrokovati ugibanje životinje.

### 3. PUT UNOŠENJA

Općenito možemo reći, da se kod niza supstancija toksičnost znatno razlikuje s obzirom na put unošenja. Za većinu spojeva vrijedi, da je otrovnost najveća pri onom načinu aplikacije, kojim otrov najbrže dospjeva o optok krvi.

Pri peroralnoj aplikaciji otrov ulazi u optok krvi preko vene porte, pri čemu jetra može u velikoj mjeri mijenjati njegovu toksičnost. Neki spojevi nisu toksični, kad se daju peroralno, a parenteralno izazivaju teška otrovanja. Ima međutim i obrnutih slučajeva. Hrana i ostali sadržaj u probavnom traktu mogu usporiti resorpciju otrova i tako smanjiti toksičnost, a kod štakora povrhu toga resorpcija može biti usporena zbog koprofagije. Nazočnost probavnih enzima i promjene u pH vrijednosti crijevnog sadržaja mogu uzrokovati razgradnju spoja i sma-

njiti njegovu toksičnost. Topljivost spoja, veličina molekule, a i njezin naboj mogu odrediti brzinu resorpcije.

S obzirom na primjenu otrova preko kože valja istaknuti, da se životinje u znatnoj mjeri razlikuju u propustljivosti kože za otrove od ljudi. Od životinjskih vrsta svinja je po građi kože najbližnja čovjeku.

U testovima inhalacione toksičnosti osnovni su faktori trajanje ekspozicije i veličina čestica udisane supstancije. Stoga se nastoji postići optimalna veličina čestica. Ako su čestice manje od 0,5 mikrona, najveći dio biva ponovo ekspiriran, dok se čestice veće od 5 mikrona zadrže u gornjim dijelovima respiratornog trakta, odakle mogu biti progutane, ali ne dopru u alveole pluća. (4, 15). Pri inhalacionoj ekspoziciji mogu životinje lizanjem unijeti otrov u probavni trakt, o čemu valja voditi računa. Rezultati inhalacionih pokusa na malim glodavcima mogu se u većini slučajeva primijeniti na ljude i domaće životinje, jer su uvjeti za resorpciju otrova gotovo jednaki.

Kod intravenozne aplikacije nije svejedno, na kojem smo mjestu injicirali istraživanu supstanciju; učinak može biti različit, već prema tome, da li je aplikacija izvršena u vratnu, femoralnu ili repnu venu. Razumljivo je, da će kod intravenozne aplikacije i brzina injiciranja, t. j. količina otrova injiciranog na minutu, znatno utjecati na sliku i ishod otrovanja. Na kraju treba spomenuti mogućnost pogrešne interpretacije rezultata, ako je zbog nedovoljnog iskustva otrov apliciran u većoj ili manjoj mjeri drugim putem, nego što smo namjeravali.

Grubo uzcvši, toksičnost nekog otrova primijenjenog intravenozno deset je puta veća od njegove peroralne otrovnosti. Odnos između intravenozne i peroralne  $LD_{50}$  vrijednosti obično pokazuje obim i brzinu resorpcije otrova u crijevu. Kod spojeva, koje organizam brzo detoksicira, brzina ulaska u cirkulaciju ima naročito značenje. Zavisnost reagiranja životinje od brzine ulaska nekih organofosfornih spojeva u optok krvi razmatrana je u vezi s toksičnim svojstvima izomera Metasystoxa i njemu srodnih spojeva (20). Tablica 5 prikazuje razlike u otrovnosti sulfonium derivata izomera Systoxa i Metasystoxa nakon peroralne, odnosno intravenozne aplikacije. Navedene razlike u toksičnosti treba sveći na većinu prije spomenutih faktora.

Tablica 5

*Akutna peroralna i intravenozna toksičnost sulfonium derivata izomera Systoxa i Metasystoxa za ženske štakore (10)*

S p o j	$LD_{50}$ (mg/kg)	
	i. v.	p. o.
00-dietil S-etilsulfonioetilmetil fosforotiolat	0,0160 (0,0143—0,0180)	oko 20
00-dimetil S-etilsulfonioetilmetil fosforotiolat	0,0615 (0, 0523—0,0724)	oko 9,8

U toksikološkim istraživanjima obično odabiremo onaj put aplikacije, koji je najbliži prirodnoj ekspoziciji otrovu. Pritom treba utvrditi, da li se neka supstancija apsorbira kroz intaktnu kožu, preko pluća ili nakon ingestije otrova. Pri istraživanju akutne toksičnosti organofosfornih spojeva perkutana aplikacija je od naročito značenja, jer je to najčešći prirodni put otrovanja.

Pored puta unošenja, koji od svoje strane može znatno utjecati na  $LD_{50}$  vrijednost istraživanog spoja, postoje drugi faktori, koji utječu na apsorpciju spoja i time indirektno na njegovu toksičnost. Krutine se apsorbiraju sporije nego kad se otrov daje u otopljenom stanju. Isto je tako poznato, da učinak iste doze otrova zavisi od koncentracije u kojoj ga primjenjujemo, i to s razloga, što je kod većih koncentracija resorpcija otrova brža. I sam karakter medija uvjetuje brzinu resorpcije. Tako se supstancije topljive u vodi resorbiraju gotovo uvijek sporije kad ih otopimo u ulju nego kad su otopljene u vodi. Prisutnost drugih supstancija, kao na primjer suspendirajućih sredstava, može usporiti resorpciju koje zbog adsorpcije otrova, a koje zbog toga, što sprečava kontakt otrova s resorptivnom površinom. Takav učinak ima i hrana u alimentarnom traktu, o čemu je bilo govora prije. S druge strane, prisutnost tenzio-aktivnih supstancija može ubrzati apsorpciju.

*Deichman* (7) je u pokusima na kunićima s Parathionom i njegovim dimetilnim analogom našao razlike u brzini resorpcije kroz kožu i alimentarna trakt, kad je otrov primijenio u različitim medijima.

Iako je voda najprikladniji medij za aplikaciju, dešava se, da zbog izrazite nestabilnosti nekog spoja u vodi, treba upotrebiti koje drugo otapalo, ili injicirati istraživanu supstanciju u nerazrijeđenom obliku. Često se dešava, naročito pri radu s organofosfornim spojevima, da istraživanu supstanciju ne možemo u dovoljnoj mjeri otopiti ili suspendirati u vodenom mediju. U takvim će slučajevima pripremanje otopine u biljnom ulju, s pomoću organskih otapala ili emulgatora, olakšati aplikaciju. Količina takvih otapala mora, međutim, biti što manja, da se njihov farmakološki učinak svede na minimum. Otapala, odnosno emulgatore, koje namjeravamo upotrebiti za pripremanje otopine, valja prethodno testirati na toksičnost i primijeniti ih u onim količinama, za koje smo sigurni da ne će utjecati na sliku otrovanja.

#### ZAKLJUČAK

Kad prosuđujemo rezultate određivanja akutne toksičnosti, treba imati na umu sve faktore i okolnosti, koje bi mogle utjecati na postignute rezultate. Varijabilnost vrijednosti dobivenih u pokusima može zavisi od čistoće uzorka, od kemijskih promjena za vrijeme pripremanja ili pohranjivanja spoja, pa od oblika i medija, u kojem smo istraživanu supstanciju primijenili. Niz faktora povezan je s putom i načinom unošenja otrova u organizam pokusne životinje. Put aplikacije određuje, u kojem će vremenu otrov dosegnuti određenu razinu u cirkulaciji, u ko-

joj će mjeri i kakvi detoksikacioni mehanizmi doći do izražaja i konačno, kojim će se putem i kojom brzinom otrov izlučiti iz organizma. Izbor pokusnih životinja s obzirom na vrstu, spol, dob, genetičke faktore, režim držanja i ishrane uvjetuje, koliko će se postignuti rezultati moći primijeniti na ljude i korisne domaće životinje, a to je jedan od osnovnih ciljeva istraživanja akutne toksičnosti.

Imajući na umu sve izvore pogrešaka, koji se mogu pojaviti u određenom pokusu i koji mogu više ili manje utjecati na krajnji rezultat, ne smijemo se zadovoljiti ocjenom toksičnosti dobivenom na temelju jednog određivanja. Kao i kod drugih istraživanja, rezultate treba potvrditi ponavljanim pokusom uz iste eksperimentalne uvjete.

Kako bi se objavljeni rezultati određivanja toksičnosti nekog spoja mogli što bolje isporučiti s drugim rezultatima, oni treba da uz osnovne statističke karakteristike sadržavaju što više podataka o eksperimentalnim uvjetima u odnosu na istraživanu supstanciju, put unošenja i tretiranu pokusnu životinju.

#### Literatura

1. Aldridge, W. N. i Barnes, J. M.: Some problems in assessing the toxicity of the 'organophosphorus' insecticides toward mammals, *Nature*, 169, (1952) 354.
2. Aldridge, W. N. i Davison, A. N.: The inhibition of erythrocyte cholinesterase by tri-esters of phosphoric acid, *Biochem. J.*, 51 (1952) 62.
3. Baetjer, Anna M. i Smith, R.: Effect of environmental temperature on reaction of mice to parathion, an anticholinesterase agent, *Amer. J. Physiol.*, 186 (1956) 39.
4. Barnes, J. M.: The use of experimental pathological techniques in assessing the toxicity of chemical compounds, objavljeno u: The application of scientific methods to industrial and service medicine, Medical Research Council, H. M. Stationery Office, London, 1951.
- 4a Barnes, J. M.: Usmeno saopćenje.
5. Barnes, J. M. i Denz, F. A.: Experimental methods used in determining chronic toxicity, *Pharmacol. Rev.*, 6 (1954) 191.
6. Chenoweth, M. B.: *Nat. Res. Council Chem. Biol. Coord. Ctr. Rev.* 2, cit: (16).
7. Deichmann, W. B., Pugliese, W. i Cassidy, J.: Effects of dimethyl and diethyl paranitrophenyl thiophosphate on experimental animals, *A. M. A. Arch. Indust. Hyg.*, 5 (1952) 44.
8. DuBois, K. P., Doull, J., Salerno, P. R. i Coon, J. M.: Studies on the toxicity and mechanism of action of *p*-nitrophenyl diethyl thionophosphate (Parathion), *J. Pharmacol.*, 95 (1949) 79.
9. Frawley, J. P., Hagan, E. C. i Fitzhugh, O. G.: A comparative pharmacological and toxicological study of organic phosphate - anticholinesterase compounds, *J. Pharmacol.*, 105 (1952) 256.
10. Heath, D. F. i Vandekar, M.: Some spontaneous reactions of *oo*-dimethyl *S*-ethyl-thioethyl phosphorothiolate and related compounds in water and on storage, and their effects on the toxicological properties of the compounds, *Biochem. J.*, 67 (1957) 187.
11. Henglein, A. i Schrader, G.: Zur Kenntnis der Isomerie-Erscheinungen bei den System-Insektiziden »Systox« und »Metasystox«, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 12.
12. Horton, R. C., Koelle, G. B., McNamara, B. P. i Pratt, H. J.: The acute toxicity of di-isopropyl fluorophosphate, *J. Pharmacol.*, 87 (1946) 414.
13. Klimmer, O. R. i Pfaff, W.: Vergleichende Untersuchungen über die Toxizität organischer Thiophosphorsäureester (I Mitteilung), *Arzneim. Forsch.*, 5 (1955) 626.

14. *Klotzsche, C.*: Zur Toxikologie neuerer insektizider Phosphorsäureester, *Arzneim. Forsch.*, 5 (1955) 436.
15. *Lehman, A. J. et al.*: Procedures for the appraisal of the toxicity of chemicals in foods, drugs and cosmetics, *Food Drug Cosmetic Law J.*, (1955) 679.
16. *Spector, W. S.*: Handbook of toxicology, Vol. I: Acute toxicities of solids, liquids and gases to laboratory animals, W. B. Saunder Co., Philadelphia-London, 1956.
17. *Svetličić, B. i Vandekar, M.*: Neobjavljeni rezultati.
18. *Thompson, W. R.*: Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose. I. Fundamental formulas, estimation of errors, and relation to other methods, *Bact. Rev.*, 11 (1947) 115.
19. United States Department of Health, Education and Welfare, Communicable Disease Center: Clinical memoranda on economic poisons, Savannah, Ga., 1956.
20. *Vandekar, M.*: The toxic properties of demeton-methyl («Metasystox») and some related compounds, *Brit. J. Indust. Med.*, 15 (1958) – u štampi.
21. *Wilhelmi, G. i Domenjoz, R.*: Therapeutische Möglichkeiten bei der Parathion-Vergiftung, *Arch. int. pharmacodyn.*, 86 (1951) 321.

#### Summary

### FACTORS INFLUENCING THE VARIABILITY OF RESULTS IN THE ASSESSMENT OF ACUTE TOXICITY

The significance of newly synthesized compounds with regard to their toxicity and health hazards both for humans and domestic animals is discussed. It is pointed out that the extrapolation of experimental toxicity data on humans and domestic animals is not possible without a thorough understanding of the mechanism of the action of the substances tested.

The factors influencing the variability of results in the assessment of acute toxicity are presented, with special reference to the determination of the toxicity of organophosphorus compounds. The authors' discussion is based on literature data and their own experience. The factors influencing the variability of results are divided into those relating (1) to the test substance, (2) to the experimental animal, and (3) to the route of administration.

Amongst the factors relating to the test substance, the presence of impurities and the conversion of the sample in the course of its preparation and storage are specially emphasized. With regard to the factors relating to the experimental animal, the effect of the species, age, sex, and genetic factors is discussed, as well as the effect of the factors influencing the condition of the experimental animal. In this connection it is pointed out that in the assessment of results the treatment of animals under observation plays an important part. Different routes of administration may also be the cause of great variability of the results. They determine how long it will take the poison to attain a certain level in the blood, what kind of the detoxifying mechanism will be put in action and to what extent, and by which route and rate the poison will be eliminated from the body. The vehicle used in the application of the test substance may also produce a considerable effect on the absorption rate of the poison.

The authors conclude that experimental data on the acute toxicity of a compound cannot be considered satisfactory, unless besides basic statistical data they contain all the information on the experimental conditions that may be of significance either to the substance tested, or the experimental animal, or the route of administration.

*Institute of Pharmacology and Toxicology,  
Veterinary Faculty, University of  
Zagreb, Zagreb  
Institute for Medical Research,  
Zagreb*

*Received for publication  
April 20, 1958*