Доклады Академии наук СССР
1955. Том 103, № 1

ФИЗИОЛОГИЯ

К. А. ГАР, Н. А. САЗОНОВА и Ю. Н. ФАДЕЕВ

ПРОНИКНОВЕНИЕ ДИМЕТИЛ-4-НИТРОФЕНИЛТИОФОСФАТА В КРОВЬ И ВЛИЯНИЕ ЕГО НА АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ КРОЛИКОВ ЧЕРЕЗ РОТ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 12 IV 1955)

В последние годы в практике сельского хозяйства все более широкое применение находят инсектициды из группы фосфорорганических соединений. Однако многие из них, являясь высокоэффективными инсектицидами, обладают высокой токсичностью для человека и теплокровных животных. Действие фосфорорганических ядов на теплокровных животных выражается в способности угнетать холинэстеразу ([1], [3]), фермент, который играет основную роль в деятельности нервной системы. Группа этих соединений включает сильнейшие из известных ингибиторов холинэстеразы, и токсичность их для теплокровных животных пропорциональна антихолинэстеразной активности. Вследствие этого наличие угнетения холинэстеразы сыворотки крови, и степень этого угнетения являются существенными физиологическими показателями степени отравления животного. Степень угнетения холинэстеразы может служить также для количественного определения инсектицида.

В настоящей работе изучено проникновение в кровь кролика одного из соединений этой группы — диметил-4-нитрофенилтиофосфата (препарат метафос *), меченного по P^{32}, и влияние проникших количеств инсектицида на активность холинэстеразы сыворотки крови.

Препарат вводился кроликам через рот в виде водных эмульсий, приготовленных на эмульгаторе ОП-7 (алкилфениловый эфир гептаэтиленгликоля). Кролики №№ 130 и 132 получили по 50 мг/кг, а кролик № 131—69 мг/кг препарата. Через различные сроки после отравления животного из ушной вены отбирались пробы крови объемом 1,5—2,0 мл. Из них 0,5 мл отбиралось для радиометрического определения количества проникшего диметил-4-нитрофенилтиофосфата и степени его разложения, а остальная часть использовалась для получения сыворотки и определения в ней активности холинэстеразы. Общее количество проникшего в кровь инсектицида определялось по интенсивности излучения 0,5 мл крови, помещенной в стандартную стеклянную чашечку. Степень разложения препарата определялась путем экстракций той же пробы водой и дихлорэтаном. Поскольку диметил-4-нитрофенилтиофосфат нерастворим в воде, наличие в водной фракции радиоактивности говорит о разложении препарата и присутствии в воде продуктов его распада, содержащих P^{32}. Отношение количества P^{32} в дихлорэтановой фракции к общему количеству P^{32}, выраженное в процентах, показывает относительное содержание неразложившегося препарата в данной пробе.

Из просмотра рис. 1 (кролики №№ 130 и 132) видно, что проникновение диметил-4-нитрофенилтиофосфата в кровь при введении препарата

* Синтез меченого диметил-4-нитрофенилтиофосфата был осуществлен Я. А. Мандельбаумом и И. В. Владимировой под руководством Н. Н. Мельникова.

в желудок проходит растянуто во времени. Максимальные количества препарата в крови отмечены через 1—3 часа после введения, затем содержание его стало снижаться и через 24 часа в крови животных оно составляло менее 1 мг/л. Иной характер носит кривая, полученная при анализе крови кролика № 131. В этом случае количество препарата постоянно нарастало и через сутки составило 16 мг/л. Очевидно, такой резкий подъем кривой связан с ослаблением защитной функции организма и уменьшением вследствие этого скорости гидролиза препарата, что и привело к накоплению токсической концентрации яда и к смерти животного.

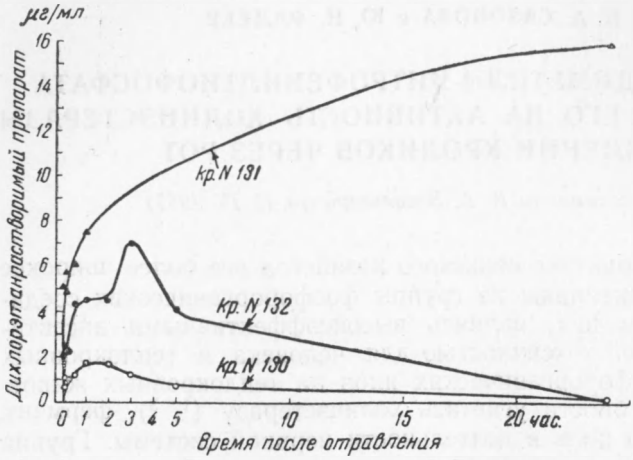


Рис. 1. Динамика содержания диметил-4-нитрофенилтиофосфата в крови кроликов

Нужно отметить, что диметил-4-нитрофенилтиофосфат, попадая в кровь, весьма быстро разрушается. Последнее видно из того, что уже в первые минуты после отравления животного значительная часть P^{32} переходила в водную фракцию. В дальнейшем относительное количество водорастворимого фосфора быстро возрастало и к исходу суток составляло подавляющую часть общего фосфора, т. е. препарат за этот период в основном разрушался. Однако и в этом случае скорость разложения диметил-4-нитрофенилтиофосфата в крови кролика № 131 заметно отличалась от таковой у двух других животных. Даже через сутки процент водорастворимого фосфора в крови был невелик, т. е. препарат разрушался медленно, что и привело к накоплению смертельной концентрации яда.

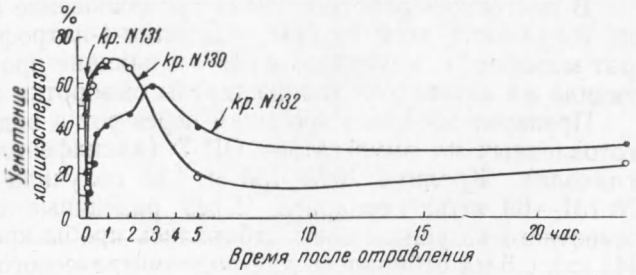


Рис. 2. Угнетение холинэстеразы диметил-4-нитрофенилтиофосфатом в крови кролика в различные сроки после отравления животного

Определение активности холинэстеразы проводилось по методу алколиметрического титрования. Принцип метода основан на гидролизе ацетилхолинхлорида холинэстеразой сыворотки крови, в результате чего образуется уксусная кислота, которую оттитровывают щелочью. Количество затраченной на титрование щелочи пропорционально активности холинэстеразы.

В специальный стеклянный цилиндр размером 14 × 45 мм помещалось 0,2 мл исследуемой сыворотки, 0,2 мл раствора 4% ацетилхолинхлорида, 1,6 мл физиологического раствора, подщелоченного Na_2HPO_4, и 3 капли 0,04% раствора крезолового красного. Смесь помещалась в водяной термостат на 1 час при температуре 30° ± 0,02°, после чего проводилось титрование 0,02 *н* NaOH стандарта окраски (подщелоченный физиологический раствор + 3 капли крезолового красного). Активность холинэстеразы опытных проб, выраженная в миллилитрах 0,02 *н* NaOH, затраченной на титрование сыворотки, сравнивалась с активностью контрольной

сыворотки, которая получалась из крови того же животного, взятой до введения препарата. Разница в активности контрольной пробы являлась показателем степени угнетения фермента. Динамика изменения активности фермента представлена на рис. 2.

Сопоставление данных рис. 1 и 2 показывает, что наибольшее подавление активности холинэстеразы, происходящее в первые часы после введения препарата, соответствует наибольшему содержанию (в сыворотке крови) растворимого в дихлорэтане фосфора, т. е. содержанию диметил-4-нитрофенилтиофосфата. Однако в более поздние сроки угнетение активности холинэстеразы оказывается завышенным в сравнении с фактическим содержанием препарата в крови, и в течение продолжительного времени активность холинэстеразы остается пониженной. Это явление, видимо, связано с тем, что активность холинэстеразы, пониженная в результате ее частичной инактивации фосфорорганическим инсектицидом, не может быть сразу восполнена за счет нового синтеза. И если скорость инактивации превышает скорость синтеза фермента, может произойти полное угнетение фермента и смерть животного, что, видимо, и имело место в случае кролика № 131.

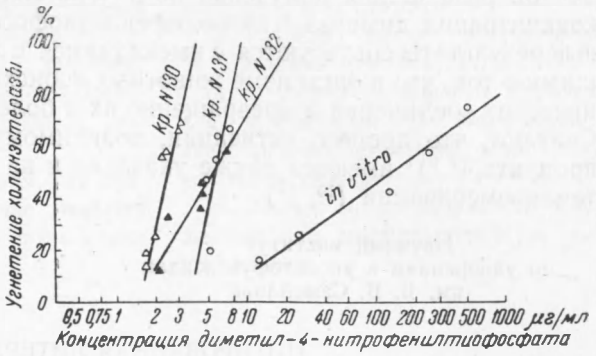


Рис. 3. Угнетение активности холинэстеразы плазмы крови кролика различными дозами диметил-4-нитрофенилтиофосфата in vivo и in vitro

Таблица 1

Найденные графически значения концентраций диметил-4-нитрофенилтиофосфата в крови кроликов (♂), вызывающие угнетение активности холинэстеразы на 50 и 80% in vitro и in vivo

№ животного	Вес в г	Доза в мг/кг	Угнетение холинэстеразы в %	
			50	80
			Концентрация мг/кг	
130	2200	50	5,5	3,45
131	1900	69	5,7	8,00
132	2200	50	5,5	12,50
in vitro	—	—	132,0	910,00

Кроме того, были поставлены опыты по определению антихолинэстеразной активности диметил-4-нитрофенилтиофосфата in vitro. Для этого к нормальной сыворотке прибавлялось определенное количество препарата и через 1 час проводилось определение активности фермента описанным выше способом. Результаты определения степени угнетения фермента in vivo и in vitro представлены на рис. 3, где по оси абсцисс отложены логарифмы концентраций диметил-4-нитрофенилтиофосфата в микрограммах на 1 мл сыворотки. Количество диметил-4-нитрофенилтиофосфата, вызвавшее данную степень угнетения фермента in vivo, определялось вышеописанным радиометрическим методом, причем активным началом считалась лишь дихлорэтанрастворимая часть препарата.

Кролики №№ 130 и 132 получили по 50 мг/кг метафоса, а кролик № 131 — 69 мг/кг. У первых двух кроликов не было заметных признаков отравления. У кролика № 131 через час после введения препарата появились острые признаки отравления, упало кровяное давление и кровь стало брать невозможно. Через сутки оказалось возможным взять пробу крови, но затем кролик погиб.

Из рассмотрения кривых рис. 3 следует, что концентрации диметил-4-нитрофенилтиофосфата, требующиеся для подавления активности холин-

эстеразы in vivo и in vitro, весьма резко различаются. Для получения равного с in vivo эффекта требуются in vitro во много раз бóльшие концентрации диметил-4-нитрофенилтиофосфата, что более наглядно представлено в табл. 1.

Из сопоставления цифр, приведенных в табл. 1, следует, что для получения in vitro 50% угнетения активности холинэстеразы требуются в 24—52 раза, а для получения 80% угнетения — в 73—260 раз бóльшие концентрации диметил-4-нитродифенилтиофосфата, чем in vivo. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными, говорящими о том, что в организме животных происходит активация фосфорорганических соединений и превращение их в более токсичные продукты ([4—6]). Считают, что процесс активации, повидимому, заключается в окислении продукта ([7—9]); имеются также указания и на возможность активации путем изомеризации ([10, 11]).

Научный институт
по удобрениям и инсектофунгисидам
им. Я. В. Самойлова

Поступило
3 XII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] G. A. Johnson, J. H. Fletcher, K. G. Nolan, J. T. Cassaday, Agric. Chemicals, 6, No. 9, 49 (1951). [2] G. A. Johnson, J. H. Fletcher, K. G. Nolan, J. T. Cassaday, J. Econ. Ent., 45, No. 2, 279 (1952). [3] R. L. Metcalf, J. Econ. Ent., 44, No. 6, 883 (1951). [4] B. A. Kilby, Chemistry and Industry, No. 33, 856 (1953). [5] J. E. Gardiner, B. A. Kilby, Biochem. J., 51, 78 (1952). [6] W. N. Aldridge, J. M. Barnes, Nature, London, 169, 345 (1952). [7] H. R. Gersman, J. A. Ketelaar, B. Mendel, D. K. Meyers, Nature, London, 170, 201 (1952). [8] J. E. Casida, T. C. Allen, M. A. Stahman, J. Am. Chem. Soc., 74, 5548 (1952). [9] J. E. Casida, T. C. Allen, M. A. Stahman, Nature, London, 172, 243 (1953). [10] W. M. Diggle, J. C. Gage, Biochem. J., 49, 491 (1951). [11] R. L. Metcalf, R. B. March, J. Econ. Ent., 46, No. 2, 288 (1953).