

Ispitivanje subakutne toksičnosti S-etil dipropiltiokarbamata (EPTC) kod kunića

S-etildipropiltiokarbamat (EPTC) je herbicid sa širokim spektrom dejstva. Ispitivan je uticaj male doze (300 mg/kg) EPTC na kuniće, praćenjem promena telesne mase i aktivnosti serumskih enzima aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP). EPTC je prouzrokovao smanjenje telesne mase, povećanje aktivnosti enzima AST, ALT, kao i smanjenje aktivnosti enzima ALP. Određivanje enzimske aktivnosti vršeno je standardnim kinetičkim metodama.

Uvod

Problem nedostatka dovoljne količine hrane za ljudsku populaciju na Zemlji, sa obzirom da se ona godišnje uvećava za oko 80 miliona ljudi, postaje sve veći. Da bi se ovaj problem rešio neophodno je povećati proizvodnju, a to je moguće na više načina: poboljšanjem genetičkog potencijala biljaka i životinja, upotrebom đubriva i drugih agrohemikalija, boljom pripremom i obradom zemljišta, kao i primenom pesticida [1].

Pesticidi su sredstva koja se koriste u poljoprivredi za suzbijanje štetnih organizama koji ugrožavaju hranu i druga čovekova dobra, a često su prenosioci uzročnika oboljenja ljudi. Pesticidi se svrstavaju u više kategorija: zoocide (insekticidi, akaricidi, rodenticidi, nematocidi, moluskocidi), fungicide, herbicide, defolijante i regulatore rasta. Pesticidi su biološki veoma aktivne supstance jer i njihove minimalne količine prouzrokuju promene fizioloških funkcija i biohemijskih procesa, a često izazivaju i promene pojedinih struktura.

Za zaštitu bilja u našoj zemlji se koristi oko 300 aktivnih pesticidnih supstanci različite hemijske strukture. Poseban problem prilikom primene pesticida predstavljaju ostaci ovih jedinjenja (rezidua) i degradacionih produkata u prirodnoj sredini, odakle najčešće hranom dospevaju u organizam čoveka i životinja.

*Gordana Branković
(1977), Beograd, Riste
Marjanovića 5, učenica
3. razreda XIII beograd-
ske gimnazije*

Sagledavanje štetnih posledica delovanja pesticida moguće je detaljnim ispitivanjem samih jedinjenja, praćenjem promena koje se javljaju kod organizama koji dolaze u kontakt sa pesticidima, kao i promena koje se dešavaju u biosistemu u celini. Stoga je ispitivanje pesticida i promena koje oni kod živih organizama mogu da izazovu nužno, svako novo saznanje je korisno i u funkciji opšte bezbednosti i racionalnog korišćenja ovih otrova.

S-etil dipropiltiokarbamat (EPTC) pripada grupi tiokarbamata koji su estri tiokarbaminske kiseline. EPTC je bezbojna do svetložuta tečnost, aromatičnog mirisa i jako isparljiva. Rastvara se u benzolu, 2-propanolu, acetonu, metanolu i ksilolu. Rastvorljivost u vodi je 365 mg/kg na 20°C. LD-50 za kuniće iznosi 10000 mg/kg pri per os primeni. Pripada III grupi otrova i otrovan je za ljude, ribe i toplokrvne životinje. Toleranca iznosi 0.05 mg/kg za kukuruz i suncokret i 0.02 mg/kg za krompir. Karenca iznosi 70 dana za krompir i pasulj. EPTC je herbicid širokog spektra dejstva. Ovaj herbicid se pod komercijalnim nazivom Arizor 80 EC (1986, Zorka Subotica) koristi za suzbijanje jednogodišnjih travnih i nekih širokolisnih (semenskih) korova u suncokretu, kukuruzu, lucerki, pasulju i krompiru.

Od velikog značaja je činjenica da je aktivna supstanca proizvod domaće sinteze koja se u potpunosti razlikuje u polaznim sirovinama i u postupku od originalne sinteze. EPTC je preemergentni herbicid koji se inkorporira u zemljište do dubine od 5-15 cm. Preko korena se brzo apsorbuje i apoplastično distribuira po celoj biljci. Moguća je i apsorpcija preko listova, kada je translokacija veoma brza.

Mehanizam herbicidnog dejstva se sastoji u inhibiciji sinteze viših masnih kiselina, sprečavanjem ugradnje acetata u njihov molekul što se postiže karbamoiliranjem tiola tkiva biljke EPTC sulfonom. Samim tim se inhibira i sinteza ugljovodonika, alkohola i estara koji ulaze u sastav voskova što izaziva njegovu redukciju na kutikuli biljke. Pored toga EPTC redukuje sintezu lipida, i inhibirajući sintezu sterola deluje reduktivno na stvaranje giberelina. EPTC narušava konverziju protohlorofila u fitohlorofil i osim toga inhibira konverziju piruvata u acetyl CoA pomoću piruvat dehidrogenaznog kompleksa.

EPTC se vrlo brzo resorbuje iz digestivnog trakta, dostiže maksimum koncentracije nakon 60 minuta, a zatim se brzo eliminiše. Tiokarbamatni herbicidi podležu brzom metabolizmu u jetri, a identifikovani metaboliti su CO₂ i urea. Cepanje tiokarbamatne grupe vrše esteraze, amidaze, oksidaze, GSH-S transferaze hepatocita. Ovaj enzimski sistem katalizuje dva metabolička puta: sulfoksidaciju (primarna) i N-dealkilaciju (manje zastupljena). Sulfoksidacija je inicijalna metabolička faza u detoksikacionom mehanizmu kod sisara. Ona počinje prevođenjem tiokarbamata u tiokarbamat-sulfoksid. Tiokarbamat sulfoksid daljom oksidacijom daje sulfon, koji je nestabilan i prisutan samo u *in vitro* uslovima. Sulfoksidi se vezuju za tiole tkiva i pri tome ih karbamoiliraju, odnosno vezuju se za proteine i konstituente krvi. Od sulfoksida zaostaje fragment sa sumporom koji daje

odgovarajuću sulfonsku kiselinu ili merkaptan. Dalje tiokarbamat sulfok-sidi bivaju izloženi napadu GSH-tiola (glutaciona) i tu reakciju katalizuju GSH-S-transferazni i NADPH enzimski sistem jetre. Hidrosolubilni produ-kti su glukoronidi i drugi konjugati hidrosilovanih metabolita.

Cilj ovog rada je ispitivanje subakutne toksičnosti EPTC kod kunića, naročito uticaj na funkciju jetre. Praćena je dinamika promene aktivnosti funkcionalnih enzima jetre: aspartat aminotransferaze (AST), alanin amino-transferaze (ALT) i alkalne fosfataze (ALP) i preko praćenja promena po-jedinih struktura u organizmu.

Metod

U eksperimentu je korišćeno pet kunića, starosti do 6 meseci, ujednačene telesne mase (1.8 kg - 2.3 kg). Hranjeni su raznovrsnom, kao i briketiranom hranom, koju su kao i vodu imali na raspolaganju. Eksperi-mentalne životinje su dobijale rastvor EPTC *per os* (pomoću pipete) u dozi od 300 mg/kg telesne mase. Aplikovan je rastvor tehničkog (96.5%) EPTC-a u jestivom ulju (300 mg EPTC u jedan ml ulja). Ova doza je životinjama aplikovana svakodnevno u trajanju od 21 dan, a nakon svakih 7 dana je praćena promena telesne mase i enzimske aktivnosti. Kao uzorak za analize enzimske aktivnosti je korišćena krv koja je uzimana iz ušne vene i iz vene porte nakon žrtvovanja životinja. Plazma je dobijena cen-trifugiranjem heparinizirane krvi 10 min. na 3000 ob/min.

Aktivnost AST i ALT urađeni su testom firme Randox kinetičkom metodom [2], a aktivnost ALP metodom hidrolize p-nitrofenilfosfata. Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja 21 dan od početka aplikacije, napravljeni su nativni i bojeni preparati (Giemsa) jetre, bubrega i slezine.

Rezultati i diskusija

Zapaženo je smanjenje telesne mase eksperimentalnih životinja do ko-ga je došlo usled njihovog izlaganja delovanju toksične supstance što je prikazano u tabeli 1.

Tabela 1. Uticaj EPTC-a na masu kunića (masa izražena u gramima)

kunić broj	vreme (dani)		
	0	7	14
1	2.350	2.000	2.000
2	2.000	1.700	1.650
3	1.850	1.750	1.700
4	2.100	2.050	2.000
5	2.000	2.000	2.000

Tabela 2. Aktivnost aspartat aminotranferaze (AST) izražena u U/l

kunić broj	vreme (dani)		
	0	7	14
1	20	23	25
2	27	11	116
3	26	13	–
4	42	21	99
5	17	21	20

Tabela 3. Aktivnost alanin aminotranferaze (ALT) izražena u U/l

kunić broj	vreme (dani)		
	0	7	14
1	15	20	23
2	20	24	67
3	26	25	–
4	39	25	118
5	23	24	26

Tabela 4. Aktivnost alkalne fosfataze (ALP) izražena u U/l

kunić broj	vreme (dani)		
	0	7	14
1	157	133	104
2	220	208	127
3	181	154	109
4	171	144	71
5	161	151	150

Tabela 5. Prikaz De Rittis-ovog koeficijenta

kunić broj	vreme (dani)		
	0	7	14
2	1.35	0.46	1.73
3	1.00	0.52	–
4	1.10	0.84	0.84
5	0.74	0.88	0.77

Kod kunića br. 1 i br. 5 dolazi do blagog povišenja aktivnosti AST i ALT, na osnovu čega se može zaključiti da je EPTC oštetio samo citoplazmu hepatocita, dok su mitohondrije ostale sačuvane. Do odstupanja dolazi kod kunića br. 2 i br. 4, koji su pokazivali i najupadljivije simptome trovanja, malaksalost, odbijali su hranu i vodu gde su vrednosti enzimske aktivnosti i do 10 puta povećane.

Kod nekih kunića je nakon prve nedelje došlo do pada aktivnosti AST i ALT, verovatno usled fiziološke adaptacije na otrov, a potom do njihovog drastičnog uvećanja. Pretpostavlja se da je u ovom slučaju došlo do jačeg oštećenja ćelija jetre, uključujući i narušavanje funkcije nekih organela prvenstveno mitohondrija.

Kod svih kunića je tokom aplikacije došlo do pada enzimske aktivnosti ALP što može ukazati na poremećaj u funkciji koštanog sistema, verovatno usled fosfatizije i delimične razgradnje koštanog tkiva. Predpostavlja se da je došlo i do masne degeneracije jetre što su pokazali i nativni preparati, dok ostali nisu bili upotrebljivi zbog loše obojenosti.

Evidentno je da je otrov doveo do poremećaja u funkcionisanju hepatocita jetre, zbog supresije enzimske aktivnosti prvenstveno ALP, a de Ritis-ov koeficijent kod kunića br. 1 i br. 2 ukazuje na mogućnost nastanka ciroze, dok kod kunića br. 4 i br. 5 ukazuje na postojanje zapaljenja i mogućeg hepatita izazvanog hemikalijom.

Zaključak

Telesna masa eksperimentalnih životinja se smanjila pri aplikaciji EPTC. Podaci o uticaju EPTC na funkcionalne enzime jetre su pokazali da je došlo do povećanja aktivnosti AST i ALT i smanjenja aktivnosti ALP što se može objasniti poremećajima procesa transaminacije i metabolisanja fosfora i njime bogatih jedinjenja kao i narušavanjem integriteta hepatocita. Rezultati istraživanja su ukazali na štetno dejstvo EPTC na jetru i koštani sistem sisara.

Literatura

- [1] Sabovljević V. 1995. Subhronična toksičnost i toksikokinetika S-etil dipropiltiokarbamata u pacova. Magistarska teza. Farmaceutski fakultet, Beograd.
- [2] Majkić-Singh N. 1994. *Medicinska biohemija*. Beograd: Društvo medicinskih biohemičara Jugoslavije.
- [3] Štraus B. 1988. *Medicinska biohemija*. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada.
- [4] Mitić N. 1992. *Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Jugoslaviji*. Beograd: Privredni pregled.

Gordana Branković

The Effect of Subacute dose of S-ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC) to Rabbits

S-ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC) is herbicide with wide spectrum of action. The fact that the active ingredient is the product of the first domestic synthesis is of the great importance. It was examined the effect of action of small dose (300 mg/kg) EPTC to rabbits, through following change of body mass and action of sera enzymes Aspartat aminotransferase (AST), Allanine aminotransferase (ALT) and Alkaline phosphatase (ALP).

EPTC caused reduction of body mass and increased AST and ALT activity and decreased activity of ALP. Analysis of enzymes activity were done with standard kinetic methods.

