

**NÉHÁNY POSZFÁTESZTER PESZTICID SZINTÉZISE ÉS
SZÖVETI OXIDATIV ANYAGCSERÉRE GYAKOROLT HATÁ-
SÁNAK VIZSGÁLATA**

Doktori dolgozat

**MINDSZENTY LÁSZLÓ
okleveles vegyész**

**Készült:
a JATE Biológiai Izotóp Laboratóriumában, Szeged**

- 1977 -

STATE UNIVERSITY OF NEW YORK
SUNY AT BINGHAMTON
LIBRARY

B 1403



TARTALOMJEGYZÉK

I. Bevezetés, célkitűzések és irodalmi előzmények	1. old.
A. Foszfátészter előállítási eljárásunk gyakorlati megvalósítása /Kémiai kísérleti rész/	6. "
B. Irodalmi előzmények és célkitűzések a foszfátészterek toxikus sajátosságainak vizsgálatával kapcsolatban.....	10. "
II. Kísérleti rész /biológiai/	15. "
III. Eredmények és megbeszélésük.	23. "
IV. Összefoglalás.....	30. "
V. Irodalom	32. "

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK ÉS IRODALMI ELŐZMÉNYEK

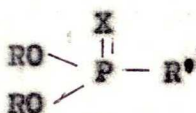
Bár a szerves foszforvegyületek története több mint egy évszázadra tekint vissza, a foszforvegyületeket a növényvédelemben három évtizede alkalmazzák kiterjedten, mióta G. SCHRADER /1/ olyan terméket állított elő, amely forradalmasította az addig ismert növényvédelem lehetőségeit. Különös jelentőséget adott ennek a folyamatnak az a felismerés, hogy a növényvédőszeresek egy másik csoportja, amelyeket klórozott aromás szénhidrogéneknek ismerünk, a talajban fokozatosan felhalmozódnak /2/ és az emberi és általában a melegvérű állati szervezetekre nézve káros hatást fejtenek ki, azoknál idült mérgezéseket okoznak.

A poliklórozott aromás vagy aliciklusos szénhidrogének említett toxicitásának az is lehet az oka elsősorban, hogy még a melegvérű állatok szöveteiben is inkább felhalmozódnak, nem játszódnak le az aktív metabolizmusuk, mint pl. a gyógyszereknek. A II. világháborúban elindult használatuk jelenleg a kumuláció mellett oda vezetett, hogy a kártevők jelentős része rezisztensé vált velük szemben.

Az elmondottakból következik, hogy egyre nő az erőfeszítés olyan növényvédőszeres, rovarirtószeres előállítására, melyek a korábbi típusú vegyületek káros, illetve hátrányos tulajdonságaival nem rendelkeznek.

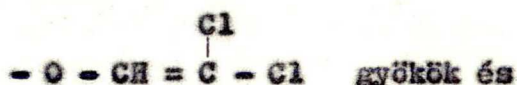
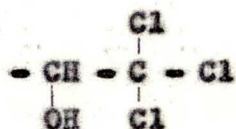
Rátérve ezek közül az egyik csoportra elmondhatjuk, ma már a foszforészter peszticideknek több olyan új típusa ismeretes, amely szobahőmérsékleten rendelkezik pl. olyan tenzióval, hogy gőzfázisba kerülve fejti ki hatását. Természetesen egyidejűleg felmerül a növényvédőszerrel dolgozók, előállítók és felhasználók szempontjából a toxicitás veszélye.

Az alábbiakban a szerves foszforvegyületek növényi védelem szempontjából hatásos, de kevésbé toxikus csoportjával foglalkozunk, amely a következő általános szerkezeti képlettel jellemezhető:



ahol a két R lehet diCH_3^- , C_2H_5^- , C_3H_7^- , C_4H_9^- , stb.

R' esetünkben



X = O vagy S.

Az irodalmi ismeretek birtokában, valamint a népgazdasági érdekek figyelembevételével célul tűztük ki olyan iparilag hasznosítható eljárás kidolgozását, amellyel közönséges hőmérsékleten, csekély energia befektetéssel, gyorsan és gazdaságosan lehetséges megadott típusú, nagyhatású szerves foszforsavészterek előállítására, illetve az ezek közvetlen kiindulási anyagául szolgáló foszforossavészterek előállítására olyan egyszerű alapanyagokból, amelyek különböző nehézségek nélkül rendelkezésünkre állanak. További célkitűzésünk volt olyan berendezés szerkesztése, mellyel folyamatos termelés érhető el az említett anyagcsoportban és ami nagymértékben megakadályozza a gyártás folyamán keletkező toxikus intermedierek és a végtermékek levegő szennyező hatását.

Korábban az említett típusú szerves foszfátok előállításait általában két úton valósították meg /4/.

a./ Az egyik módszernél klorálból és a megfelelő dialkylfoszfitból indultak ki. Ezt az utat több német és angol szabadalom követi, de találhatók a vázolt reakciók alkalmazására egyéb eljárások is.

b./ A második megoldásnál a kiindulási anyag a klorál és a megfelelő trialkylfoszfit.

Mindkét reakció út a szabadalmazott eljárások közös jellemzője, úgy hogy a fenti reakciók 50 °C körüli hőmérsékleten elvégezhetők, megfelelő keverés biztosításakor. A reakció befejeztével azonnali desztillációt alkalmaznak a melléktermékek eltávolítására, hogy kiküszöböljék a reakció végtermék részleges visszaalakulását a kiindulási anyaggá, vagy az intermedierekké.

Az általunk kidolgozott eljárásnak az volt a lényege, hogy a reakció sebességet meggyorsítottuk azzal, hogy a reakció kiindulási anyagait nagy felületen gáz- vagy gőzfázisban reagáltattuk, ami a lejátszódó reakció hatásfokát erősen megnövelte. A fenti célt úgy értük el, hogy a részreakciók, illetve műveletek számának megfelelő számú vízszintes vagy függőleges elrendezésben sorbakapcsolt szalag- vagy függöny reaktorban játszottuk le a reakciót, az alapanyagok vagy köztitermékek egyidejű filmszerű beadagolásával, vagy olyan ütemű összeporlasztásával, hogy a hőmérséklet szabályozása optimális kitermelés érdekében megvalósuljon. Így közönséges hőmérsékleten keverés nélkül, fűtés illetve hűtés nélkül a felvázolt reakció kivitelezhetővé válik. Az eljárással nagy hatásfokkal szerves foszforsavészterek állíthatók elő, vagy azok kiindulási anyagai, a megfelelő foszforossavészterek. Eljárásunk lehetőséget nyújt arra is, hogy mindkét említett reakcióút szerint folyamatos előállítást valósítsunk meg, akár dialkylfoszfit vagy trialkylfoszfit, akár foszfortriklorid és a megfelelő alkohol

kiindulási anyagként történő alkalmazásával, úgy hogy a végtermék előállításához szükséges klorált valamennyi esetben az utolsó lépésben adagoljuk a rendszerbe.

Amennyiben foszfortrikloridból és a megfelelő alkoholból indulunk ki, úgy első lépésben a kiindulási anyag arányoknak megfelelően dialkilfoszfit, vagy a trialkilfoszfit állítható elő. Ez az irodalomban /5/ keverősreaktorban fűtés, illetőleg hűtés alkalmazása mellett valósul meg, mindenkor valamilyen sósav megkötő anyag alkalmazása mellett.

Eljárásunknál a szalag- illetve függöny reaktor által biztosított nagy felület és az ellenáramban bevezetett indifferens gáz /széndioxid, nitrogén/ hivatott biztosítani a sósav eltávolítását a folyamatosan működő rendszerből. Számos kísérlettel bizonyítottuk azonban, hogy ezeknek a gázoknak egyszerű alkalmazása nem oldja meg a sósav maradéktalan kiűzését a rendszerből. Ezek után más megoldást kerestünk, amely az irodalmi részben megadott szabadalomban ismertetett módszerrel történhet meg /6/.

Az előállított, nagy kitermeléssel keletkezett terméket a következő reakció lépcsőben azonnal felhasználhatjuk, reagáltatható klorállal, vagy egyéb komponenssel. Hasonló ok miatt a köztitermékeként keletkező foszfitoknak és végtermék foszfátoknak szükségetelenné válik a desztillálása /izolálása/, mivel a gáz alakú melléktermékek folyamatos elvezetése megakadályozza a reakció részleges visszafordulását.

A reakció megvalósításához alkalmazott berendezésünket abból afelismerésből fejlesztettük ki, hogy üvegszál, vagy fonálon heterogén fázisú reakciókat kivitelezve, a nagy felület miatt többek között a reakciók sebessége erősen megnövekszik és lefolyása igen jó termelésűre válik. Részle-

tesebben mindez azzal magyarázható, hogy a függőlegesen álló fonálon gravitációval lefolyó kiindulási anyagoknak részben a fonálhoz viszonyított felületi feszültség következtében, részben a fonál terelő hatása és a fonálon kialakuló mikroturbulencia folytán nagymértékben megnövekszik a felülete, ami elősegíti a reakció lefolyását olyannyira, hogy az a klasszikus kivitelű körülményeknél lényegesen alacsonyabb hőmérsékleten és rövidebb idő alatt is lejátszódik és ezáltal a gyártás teljesen folyamatossá tehető. Fonalakból lényegében plánparallelesítéssel szalag- illetve függöny rendszer alakítható ki, melynek hatásfoka többszöröse a fonálénak, így az említett hatások még kifejezettebben érvényesülnek. A kialakítandó 3-5, de akár esetleg 10-20 méter hosszú szalagok illetve függönyök függőlegesen álló üveg-, rozsdamentes acél-, műanyag vagy egyéb ellenálló szerkezeti anyagból elkészített csőben, egymás mellett 5-10 cm-re vannak elhelyezve, egymással párhuzamosan lazán, vagy kifeszítve. Az így kialakuló párhuzamos területek között levegő vagy más gáz áramolhat tetszőleges irányba. A szalag vagy függöny mentén tetszőleges magasságban, a reaktorcső hosszában, több helyen nyílás készíthető, melyeken át szükség szerint minta vehető. Így a reakció előrehaladását analitikai módszerekkel a reakció minden fázisában könnyen követhetjük.

Maga a reaktor szalag, vagy függöny készülhet bármilyen a reakciókomponenseknek, melléktermékeknek vagy végtermékeknek ellenálló szerkezetű anyagból: üveg, műanyag /poli-
etilén, polipropilén, poliészter, PVC, stb./ szövetből vagy kerámiából.



**A/ FOSZFÁTÉSZTER ELŐÁLLITÁSI ELJÁRÁSUNK
GYAKORLATI MEGVALÓSÍTÁSA.
/Kémiai kísérleti rész/**

Az előzőekben elvileg ismertetett eljárást több példán részletesen be kívánjuk mutatni. Az általános mol arányokra és eljárásra álljon itt egy példa:

Általában 1 mol foszfortrikloridra a megfelelő alkohol 3 molját /célszerű az alkoholt csekély feleslegben adni/ egy háromlépcsős függöny reaktor első fokozatában a kiindulási anyagokat összefolyatással, filmszerű adagolással hozzuk reakcióba, vagy részporlasztóval a függönyre porlasztjuk olyan ütemben, hogy a termelés maximális legyen.

A kiindulási anyagok adagolása nagymértékben az alkalmazott szalag, vagy függöny felület nagyságától és a reaktor méreteitől függ. Ezt mindenkor a reakciónak megfelelően kísérletileg kell megállapítani.

A második lépcsővel történik a sósavgáz folyamatos eltávolítása /7/. A képződött foszfitot viszont a harmadik lépéssel tovább reagáltatjuk, pl. klorállal történő egyidejű beporlasztással úgy, hogy az első két fokozatban keletkező foszfitnak megfelelő mennyiségű klorált alkalmazunk. A reaktorcső alsó végén elhelyezett szedőedényben esetleges kismértékű utóreakció lejátszódásával a reakció gyakorlatilag teljessé válik. Ebből az edényből különböző technológiával folyamatosan távolítjuk el a készterméket.

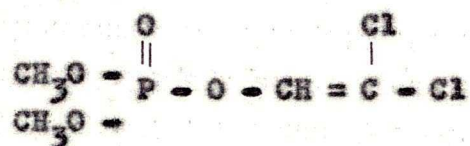
A harmadik lépcsőben minden klorál molekulából a megfelelő alkilklorid egy molekulája keletkezik, amelyet a rendszerben alkalmazott gyenge szívás hatására az első fokozat felé áramlik és keveredve más gázokkal, ezekkel együtt távozik a berendezésből.

Abban az esetben, ha kész di-, vagy trialkilfoszfátból indulunk ki, akkor a berendezés egyetlen megfelelő hosszú-

ságú, egy fokozatú függöny reaktorból áll és nem szükséges több reaktor sorba kapcsolása.

A gyakorlatban kipróbált és laboratóriumi körülmények között kivitelezett két reakció típust mutatunk be.

1. példa: Az o,o-dimetil-2,2-diklorvinilfoszfát előállítása /DDVP/:

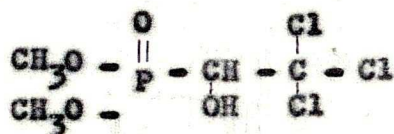


Trimetilfoszfitot és klorált zárt csőben felfüggesztett üveg függöny felső részére 1255,2 g/óra, illetve 1682,0 g/óra befúvási sebesség mellett összeporlasztunk. A függönnyt 10 cm széles, 290 cm hosszú üvegszövet képezi, amely egy 300 cm hosszú és 20 cm belső átmérőjű zárt üvegcsőben helyezkedik el. A fenti adagolási sebesség mellett a reaktor üzemi hőmérséklete 100-110 °C.

A keletkező gáz alakú mellékterméket a metilkloridot, illetve a gőz halmazállapotú reagálatlan klorált, illetve trimetilfoszfitot a reaktorcső alsó részén elhelyezett vákuumszivattyúval és elnyelető rendszerrel összekötött szivócsanak segítségével folyamatosan eltávolítjuk. A folyékony végtermék a reaktorcső alsó részén elhelyezett szedőedényben összegyűlik.

Kitermelés: 95-96 % tiszta hatóanyag, amelyet 90 %-os kitermeléssel nyerünk.

2. példa: Az o,o-dimetil-1-hidroxi-2,2,2-trikloretilfoszfát előállítása. /TRIKLORFON/



Az előbbi példában leírt készülékben dimetilfoszfitot és klorált zárt reaktorcsőben 1100 g/óra illetve 1475 g/óra befolyási sebességgel összehorlasztottunk. A fenti adagolási sebesség mellett a reaktor üzemi hőmérséklete 95-110 °C. A reagálatlan, gőz halmazállapotban lévő klorált illetve dimetilfoszfitot folyamatosan eltávolítjuk a reaktorcső alján elhelyezett vákuumszivattyúval és elnyeletjük a rendszerrel összekötött szívócsonk alkalmazásával. A végtermék a reaktorcső alsó végén elhelyezett szedőedényben gyűlik össze.

Kitermelés: 94-98 % hatóanyagtartalmú, 92 %-os terméshozamot nyerünk.

A reakciók gyakorlati, üzemi kivitelezése közben több munkavédelmi probléma merült fel, amelyek indokoltá tették az említett anyagokkal néhány olyan vizsgálat elvégzését, illetve az ott dolgozók toxikus hatások szempontjából történő megfigyelését.

A reaktorban az első esetben az említett vegyület a DDVP előállítására folyt. Előbb egy rövidebb periodus alatt - 30 nap - majd hosszabb időtartamig - 6 hónap után - megfigyeltük hat munkás adatait, akik közül három a hatóanyag előállításával, három pedig a hatóanyagból 1 %-os oldat készítésével foglalkoztak. A munkakörülmények a kísérlet alatt kezdetlegesen voltak, ezért főleg a bőrön keresztül való felszívódás volt várható. Miután az 1 %-os oldatot a kereskedelemben aerosol formájában forgalmazott módon bárki beszerezheti, a vizsgálat kiterjedt a munkahely légtérébe kerülő, az említett aerosolból származó DDVP koncentráció mérésére is. Ezenkívül mértük a protektív célt szolgáló gumikesztyűk DDVP tartalmát, amunkások vérplazmájának kolineszteráz aktivitását és A-vitamin szintjét /8/.

A DDVP önmagában, de szerves oldószerben történő feloldás után oldatban is duzzasztja a természetes gumiból készült eszközöket, pl. kesztyűt, ezért az ilyen kesztyűben dolgozók bőre mintegy állandó kesztyűhöz "kötődő" DDVP-vel volt kapcsolatban. A DDVP, mint szerves oxoészter könnyen átjut a bőrön, ezt a vérplazmában a csökkenő kolinszteráz szint és vele együtt csökkenő A-vitamin mennyiség mutatta. Amikor a munkásokat ebből a munkakörből kiemelték, illetve a későbbiek folyamán a munkavédelmi előírásokat pontosan betartották /megfelelő elszívás alkalmazása a levegőbe került DDVP aeroszol mennyiségének csökkentésére és a növényi gumiból készült kesztyű kicserélése klorkaucsuk védőkesztyűre, amely DDVP oldatban nem duzzad, így azt nem engedi diffundálni/, az előbbi paraméterek a vérplazmában hosszabb-rövidebb idő alatt normalizálódtak.

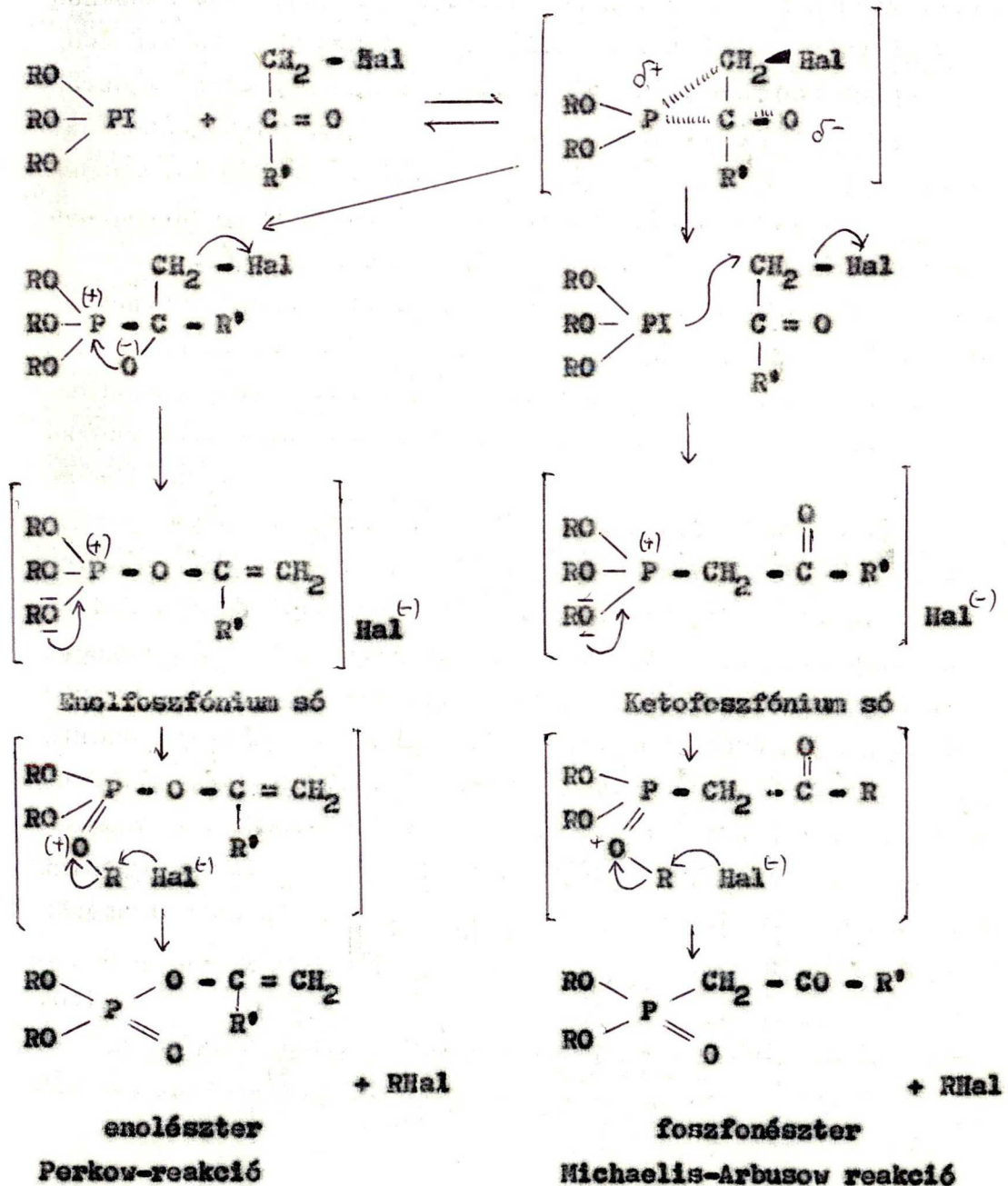
Ebből az egyszerű megfigyelésből kiindulva más, permeatószerrel összeköttetésbe kerülő munkásokat is vizsgáltunk /9/ és megfigyeléseinket kiegészítettük öngyilkossági kísérletekkel, ahol a foszforsavészterek nem véletlenül, vagy baleset következtében kerültek az emberi szervezetbe, hanem szándékosan.

A korábban említett megfigyeléseinket, tehát a vér kolinszteráz csökkenést minden egyes esetben újból tapasztaltuk együtt a plazma A-vitamin szint csökkenésével. A regenerálódás fázisában mindkét paraméter hosszabb-rövidebb idő alatt normalizálódott. Megfigyelésünket öngyilkosságban elhalt egyének post mortem vizsgálatakor nyert máj analízisekkel kiegészítettük, amikor megmértük a máj A-vitamin tartalmát. Ezekben az esetekben azokat az érdekes jelenségeket tapasztaltuk, hogy míg ante mortem a vérplazmából az A-vitamint csak nyomokban lehetett kimutatni, ugyanezen egyén májában az A-vitamin tartalmak lényeges változást nem mutatott.

A leírtak elméleti kérdéseket vetettek fel, amely megoldását az irodalmi részben ismertetjük.

B/ IRODALMI ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK A FOSZFÁT-
ÉSZTEREK TOXIKUS SAJÁTSÁGAINAK VIZSGÁLATÁVAL
KAPCSOLATBAN.

A szabadalmi eljárásban leírt célkitűzések megvalósí-
tását nagymértékben elősegítették azok az irodalmi adatok,
amelyeket Michaelis-Arbusow és Perkow-reakcióként ismerünk
/10/ és amelyeket Cramer /11/ vizsgált meg és tanulmányo-
zott részletesen:



Ugyancsak a célkitűzések között szerepel a foszforészter típusú növényvédőszer toxicitásával kapcsolatos azon felismerés, amelynek megoldása azt eredményezné, hogy részben magyarázni lehetne a mérgezéssel kapcsolatban ma még megoldatlan jelenségeket, nevezetesen azt, hogy foszforsavészter mérgezésben bekövetkező fatális fordulat miért akkor jön létre legtöbbször, amikor már a kolinszteráz mérgezés járuló tendenciát mutat / a kolinszteráz aktivitás a vérplazmában lassan ismét emelkedni kezd/, másrészt ha a fenti kérdésre feleletet kapnánk, meg lehetne találni azokat a gyógyszereket, amelyek preventív alkalmazása, vagy a mérgezés utáni gyors adagolása a mérgezés veszélyét csökkentené vagy teljesen kiküszöbölné.

Emberi megfigyeléseinkből származó adataink figyelmünket az A-vitamin anyagcsere problémája felé irányította. Az A-vitamin olyan 20 szénatomos vegyület, amiről tudjuk, nélkülözhetetlen az élethez, de érdekes módon az A-vitamin hatás pontos reakciómechanizmusát eddig még csak a látással kapcsolatban ismerjük. /Wald; 12/ Wald az említett munkájáért Nobel-díjat kapott. Az A-vitamin egyéb reakcióiban, növekedésben, avagy a hiány állapotban /A-hipovitaminózis vagy A-avitaminózis/ játszott szerepéről csak az A-avitaminózisban előidézett jelenségekből következtetünk /fokozott gyulladáscsökkentő folyamatok, növekedés visszamaradása, fehérje szintézis problémák, amelyek az A-avitaminózishoz kapcsolódnak, xerophthalmia, stb./. Az A-avitaminózis molekuláris hatásmechanizmusát ezideig nem ismerték.

Arról, hogy az A-vitamin és a foszforsavészterek biológiai hatásmechanizmusa között összefüggés van, Seshadry Sastry és Ganguly /13/ korábbi vizsgálataiból kitűnik. Az említett szerzők szerves foszforészter alkalmazásával kísérleti állatok máj homogenizátumából több enzimet,

elsősorban eszterázát különítették el. Ezen kísérletek alapján feltételezhetjük, hogy a szervezetben van egy A-vitamin eszteráz /EC 3.1.1.12/, amelynek az a szerepe, hogy a máj-sejtekben tartalékként A-vitamint észterkötéséből hidrolízis útján felszabadítja és ezzel biztosítja, hogy az A-vitamin szabad alkohol formájában bekerüljön a véráramba, ahol a plazmafehérjékhez kapcsolva elszállítódik az anyagcserebe. Bár az említett kísérleteket már 1961-ben elvégezték, eddig nem találkoztunk olyan irodalmi adatokkal, amelyek támogatják volna azt a feltételezést, hogy a szerves foszfátszázamazók kolineszteráz bénító hatása más enzim rendszerek mellett az A-vitamin eszteráz működését is befolyásolták volna. Ismert viszont, hogy a kolineszteráz enzim egyik fajtája ugyanazon Kupffer sejtekben keletkezik, amelyek az A-vitamin észtereket raktározzák a májban.

Más szerzők, B.C. Johnson és G. Wolf /14/ már 1960-ban végeztek olyan állatkísérletet, amelyből kitűnt, hogy az A-vitamin anyagcsere valamilyen módon összefügg a glikogén bioszintézisével, amennyiben A-vitamin hiányos állapotba hozott kísérleti állat mellékvese kéregállománya A-vitaminban elszegényedik. A gondos vizsgálat megállapította, hogy a patkány glikogén bioszintézise több lépésben gátolt súlyos A-vitamin hiányban, ami többek között pl. azt eredményezi, hogy az állat nem tudja kivédeni pl. a hűtéssel kiváltott stresszt.

Jóval később Kahn /15/ azt figyelte meg, hogy ha Hypoderma lárzával fertőzött borjakat RUELENE^R-nel kezelik /RUELENE: O-2-chlor-4-tert.-butylphenyl/-O-methyl-N-methyl-phosphorsäure-amid/, azokon szerves foszfátészter mérgezés jelentkezett már a kezelés első napján. Bár azonnal megkezdtek a szokásos antidotumok adagolását /Atropin, vérátömlesztés, antihisztaminok, gyulladáscsökkentők/, a mérgezés

akut tüneteinek megszűnte után mégsem tudtak a borjak lábra állni. Az említett szerző ezután 1,5 mill. NE gyorsan fel szívódó A-vitamin készítményt adott intramusculárisan a mérgezett állatoknak, ami után a korábban még járásképtelen borjak meggyógyultak.

Ebből a néhány adatból és saját megfigyeléseinkből kiindulva jutottunk arra az elhatározásra, hogy a foszfor-savészter mérgezést kísérleti állatokon tesszük tanulmány tárgyává.

Szintén irodalmi adat az, hogy az A-vitamin hiányban, illetve bizonyos túlsúlyban a sejt külső membránok, illetve a sejt belső membránjai sérülékenyebbé válnak /16/.

Külföldi /17/ és magyar szerzők /18/ adataiból arra következtettünk, hogy a felsorolt A-vitamin anyagcsere zavarok következtében a sejt membrán öregedése gyorsabban következik be, ami a politelitetlen lipidek fokozott lebontásával függhet össze, az említett folyamatokhoz köze lehet a molekuláris oxigénből keletkező szuperoxid gyöknek is.

A fent felsorolt irodalmi adatok eléggé szerteágazóak voltak és az ebből levonható elméleti következtetések sem egységesek, azonban mégis ezek a megfontolások irányították figyelmünket arra, hogy összefüggés állhat fenn a foszforészter szintézis során, az elégtelen munkavédelem következtében, vagy egyéb okok miatt előálló intoxikáció és a szervezet A-vitamin anyagcsere folyamata között. A kérdés megoldása, vagy megközelítése gyakorlati fontosságú azért, mert esetleg igen egyszerű preventív eszközökkel könnyebb lefolyású mérgezéseket megelőzhetünk, vagy gyors regenerálódást mozdíthatunk elő oki therápiával.

Visszatérve a szuperoxid O_2^- gyök anionra, ami minden molekuláris oxigén involválta folyamatnál keletkezik, amit a szuperoxid dizmutáz /SOD; EC 1.15.1.1/ nevű enzim inaktívál, a foszforészter hatás molekuláris mechanizmusának a fel-

derítésekor legalábbis enzimikus oldalról indokoltnak látszott. A SOD az O_2^- aniont H_2O_2 és O_2 -vé alakítja. Ni a többi peroxid anyagcsere enzimet, nevezetesen a katalázt /EC 1.11.1.6/ és a peroxidázt /EC 1.11.1.7/ is megvizsgáltuk.

Kataláz aktivitást csak néhány esetben mértünk, viszont peroxidáz aktivitást mindig. A peroxidáz aktivitás normál patkány májban igen alacsony, de néha idegen anyagok hatására aktivitása megnövekszik.

II. KISÉRLETI RÉSZ /biológiai/.

Anyagok, módszerek.

1./ A kísérleti részhez szorosan kapcsolódó foszfát-észter kémiai szintézist már korábban általános formában és két példán részletesen ismertettük.

2./ Szöveti kolineszteráz aktivitás meghatározás.

A kolineszteráz meghatározáshoz májszövetet használunk, H.O. Michel /19/ írta le a meghatározás alapszabványát. Iván J. és mtsai az említett módszert módosították.

A meghatározás lényege, hogy fiziológias sóoldattal készített májszövet homogenizátumból barbitál-pufferrel lugos elegyet állítunk elő, majd az említett elegyhez szubsztrátot adva és inkubálva a képződött ecetsav hatására bekövetkezett pH változást elektrometriásan mérjük.

Anyagok: 0,006 M nátrium barbituricum

0,001 M KH_2PO_4

0,20 M NaCl, amihez 900 ml deszt. vizet adunk az anyagok feloldására, ezután 11,6 ml 0,1 N HCl-at teszünk a mérőlombikba és az egészet deszt. vízzel 1000 ml-re egészítjük ki. A puffer pH-ja így 8,0 lesz 25 °C-on.

Szubsztrát: butiril-klorid 5×10^{-3} M/4 ml végtérfogatban;

Inhibitor: physostigmin 1×10^{-4} M/ 4 ml végtérfogatban.

Inkubálás ideje: 3 óra, 37 °C-on.

Alkalmazott mérőműszer: Radiométer PHM 71.

A méréshez a szöveti pH eltolódás korrekciójára azonos körülmények között kezelt, kontrol állatból származó mintát mérünk be, amelyben az enzim reakciót a mérés kezdetén hozzáadott inhibitorral leállítjuk. A reakció végpontjában mért pH értékeket a kontrol mintához úgy viszonyítjuk, hogy a kontrol pH értékből kivonjuk a minták inkubálás végpontjában mért pH értékét. Ezt a pH különbséget az elbomlott

butiril-klorid mikromolban kifejezett koncentrációban adjuk meg. A bemérés szövetre számítva 10 mg májnak felel meg, a végeredményt /egység/ E = 1 mikroM szubsztrát / g /perc értékben adjuk meg.

A módszerhez tartozik, hogy az inkubáláshoz bemérendő mintákat, a fiziológias sóoldattal történt homogenizátumból 4500 rpm/10 perc centrifugálás után a felüluszóbból mérjük be, ezzel elérve, hogy a sejtmag, a sejtmembrán az üledekben marad, míg a vízoldható enzim a bemért mintához kerül.

3./ Szöveti szuperoxid dizmutáz meghatározás /18/.

Az SOD aktivitás mérés lényege, hogy a SOD koncentrációjától függően gátolja az adrenalin \rightarrow adrenochrom pH 10,2-nél, levegő jelenlétében lejátszódó spontán oxidációját, tehát az adrenochrom keletkezés okozta színintenzitás növekedést.

Anyagok: 0,05M-os, pH 7,8-as foszfát puffer oldat,

0,05 N-es pH 10,2-es nátriumkarbonát-sósav puffer,

EDTA oldat: 11,167 mg EDTA-t oldunk 100 ml pH 10,2-es nátriumkarbonát-sósav pufferben.

Adrenalin oldat: 16,488 mg kristályos adrenalint oldunk pH 2-es 0,1 N sósavban.

Alkalmazott mérőműszer: Spektromon 360 spektrofotométer

A mérést 25 °C-on 480 nm-nél, 1 cm-es üvegküvetében végeztük. A mérőoldatok össztérfogata 3 ml volt.

A vak összetevői:

2 ml pH 10,2-es nátriumkarbonát-sósav puffer,
1 ml EDTA oldat.

A kontrol próba a következő oldatokból áll:

1,9 ml pH 10,2-es nátriumkarbonát-sósav puffer,
1,0 ml pH 7,8-as, 0,05 N-es foszfát puffer,
0,1 ml adrenalin oldat.

Minta komponensei:

- x ml homogenizátum /x = 0,1-0,01 ml/
- 1,9 ml pH 10,2-es nátriumkarbonát-sósav puffer
- 1,0 ml pH 7,8-as foszfát puffer
- 0,1 ml adrenalin oldat.

A reakciót az adrenalin oldat hozzáadásakor indítjuk, amit stopperórával mérünk. A mérést 5-10 percig folytatjuk, percenként leolvassva az extinkció változásokat.

A SOD aktivitási érték kiszámolása kalibrációs görbe segítségével történik /lásd az 1. ábrát/.

4./ Szöveti peroxidáz aktivitás meghatározás./18/

Az aktivitás mérés lényege, hogy a peroxidáz hidrogénhiperoxid jelenlétében, az enzim aktivitásától függően, a szubsztrátként használt guajakolt tetraguajakollá alakítja, a színmélyülés fotometrálnak és a peroxidáz enzim koncentráció függvénye.

Anyagok: 0,01 M, pH 7,0 foszfát puffer,

Guajakol oldat: 0,22 ml guajakolt 100 deszt. vízben oldunk.

H₂O₂ oldat: 0,16 ml 30 %-os H₂O₂-ot 100 ml deszt. vízben oldunk.

A vakpróba összetevői:

- 2,5 ml 0,01 M-os pH 7,0-es foszfát puffer,
- 0,5 ml guajakol oldat.

A minta komponensei:

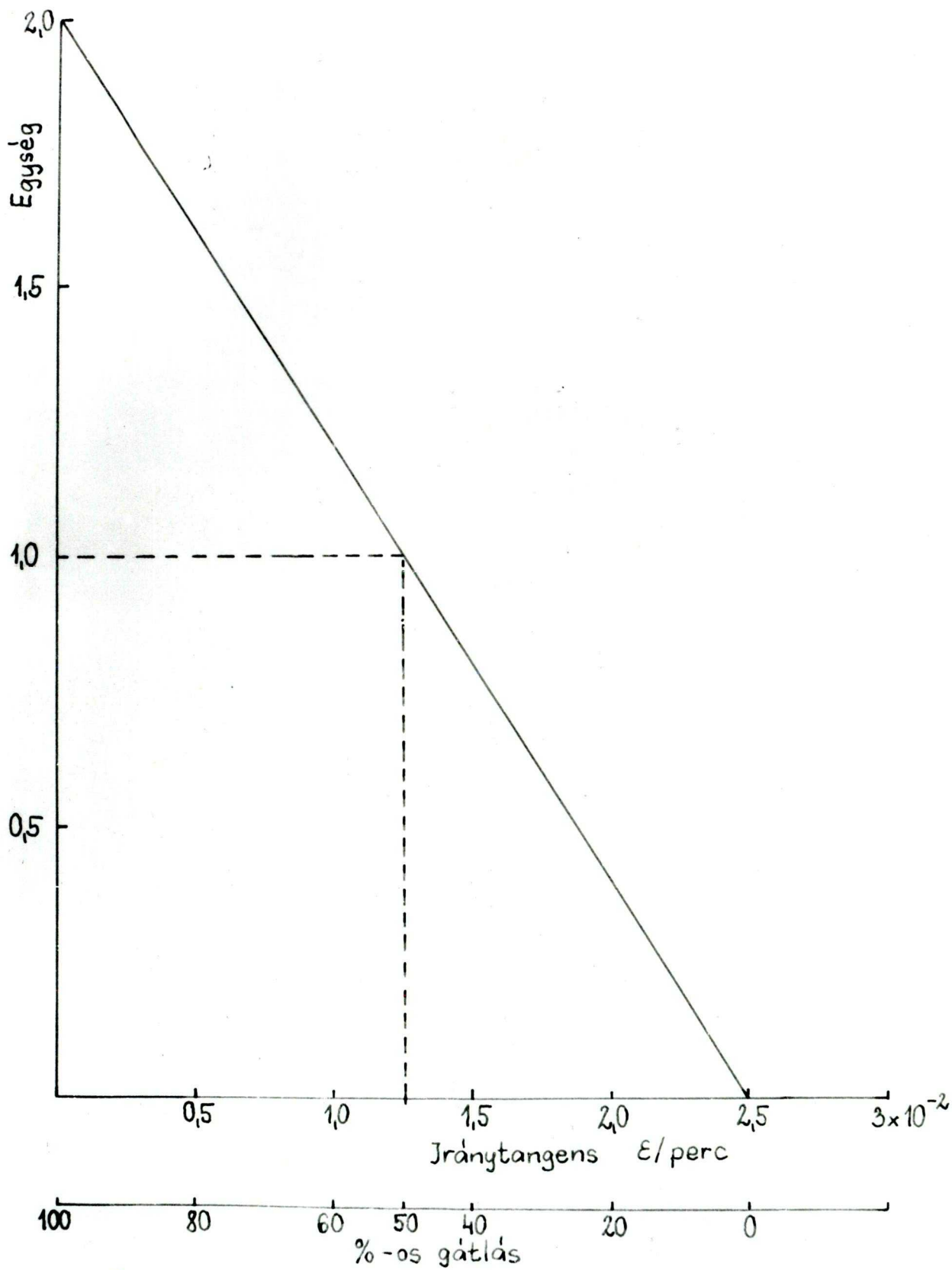
- 2,3 ml pH 7,0-es foszfát puffer,
- 0,5 ml guajakol oldat, 0,2 ml H₂O₂ oldat.

A méréskor a bemért homogenizátum mennyiségét számításba vesszük a puffer térfogatánál. Tehát a bemért homogenizátum mennyiségétől függ a puffer térfogata.

Alkalmazott mérőműszer: Spektromon 360 spektrofotométer

A mérést 25 °C-on, 470 nm-nél, 1 cm-es üvegváltóban végeztük. A mérőoldatok össztérfogata 3 ml volt.

Az extinkció változását percenként olvastuk le, a H₂O₂ oldat mintához adásától számítva 3 percen keresztül.



1. ábra

Számítás:

$$A = \frac{4 \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t}}{26,6} \cdot 100$$

ahol: A = enzim aktivitás egység,

$\frac{\Delta E}{\Delta t}$ = perconkénti extinkció változás

Δt

26,6 = extinkciós koefficiens.

A peroxidáz aktivitás kiszámolására grafikont használtunk /2. ábra/.

5./ Szöveti kataláz aktivitás meghatározás /18/.

A kataláz aktivitás meghatározásánál a H_2O_2 mennyiség csökkenését követjük időben. A H_2O_2 csökkenést a vegyület ultraibolya elnyelési maximuma területén mérjük az idő függvényében.

Anyagok: 0,05 M-os pH 7,8-as foszfát puffer,

H_2O_2 oldat: 0,17 ml 30 %-os H_2O_2 -ot a fenti foszfát pufferrel 50 ml térfogatra hígítunk.

A vakpróba összetevői:

a mintával megegyező térfogatú aktív enzimet tartalmazó homogenizátumot és 3,0 ml-re történő kiegészítésig 0,05 M-os pH 7,0-es foszfát puffert tartalmaz.

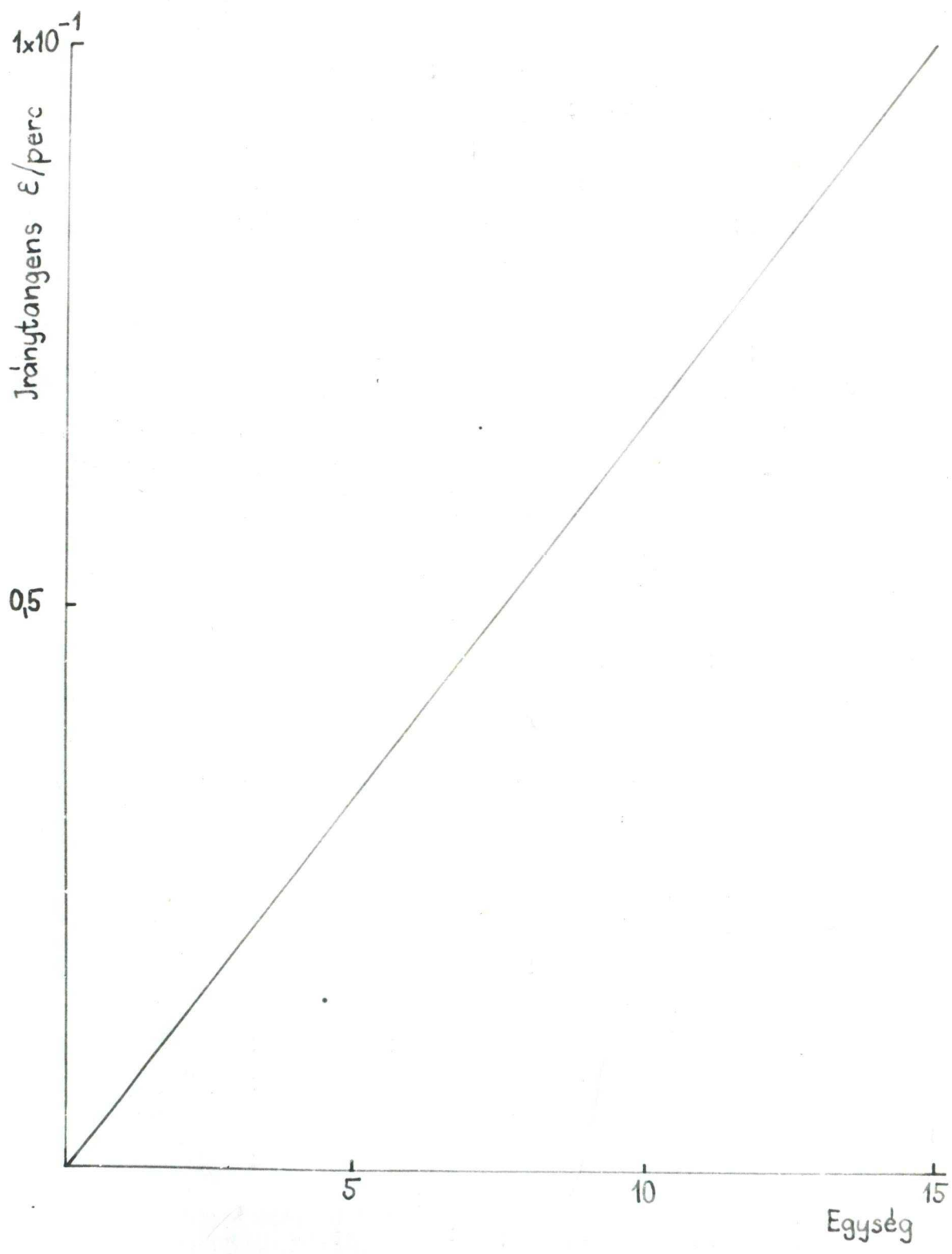
A minta komponensei:

2,0 ml pH 7,0-es 0,05 M-os foszfát puffer,
0,005-0,05 ml aktív enzimet tartalmazó homogenizátum,

1,0 ml H_2O_2 oldat.

Alkalmazott mérőműszer: Spektromom 202 spektrofotométer

A mérés 25 °C-on, 240 nm-nél, 1 cm-es kvarzküvetében végeztük. A mérőoldatok össztérfogata 3 ml volt.



2. ábra

A kataláz mérése Bergmeyer egységekben történik, amit grafikonból olvastunk le.

1 Bergmeyer egység = 1 g H_2O_2 fogyás/perc, 25 °C-on.

Amennyiben a mérés közben buborék képződést észleltünk, akkor a vizsgálandó oldatot higitani kell, és a higitás mértékét az enzim aktivitás számításánál figyelembe kell venni. A méréshez felhasznált oldatok előzőleg kiforalt és szobahőmérsékletre hűtött deszt. vízzel készültek az oldott oxigén mennyiségének csökkentése céljából.

A kataláz aktivitás leolvasásához használt görbét a 3. ábra mutatja be.

6./ Szöveti malondialdehid meghatározás [18].

A malondialdehid mennyiségét májszövetből úgy mértük, hogy a májszövetet 4 °C-on fiziológias sóoldattal történő homogenizálás után nátriumklorid-TRIS pufferben inkubáltuk. A fehérjék kicsapását és a képződött malondialdehid tiobarbitursavval előállított színreakcióját 37 °C-on végeztük, majd az elegyet 90 °C-ra melegítettük. A csapadék elkülönítése centrifugálással történt, és a színintenzitást spektrofotométerrel értékeltük.

Anyagok: 400 mM NaCl

100 mM TRIS

N sósavból előállított pH 8,0-as puffer,

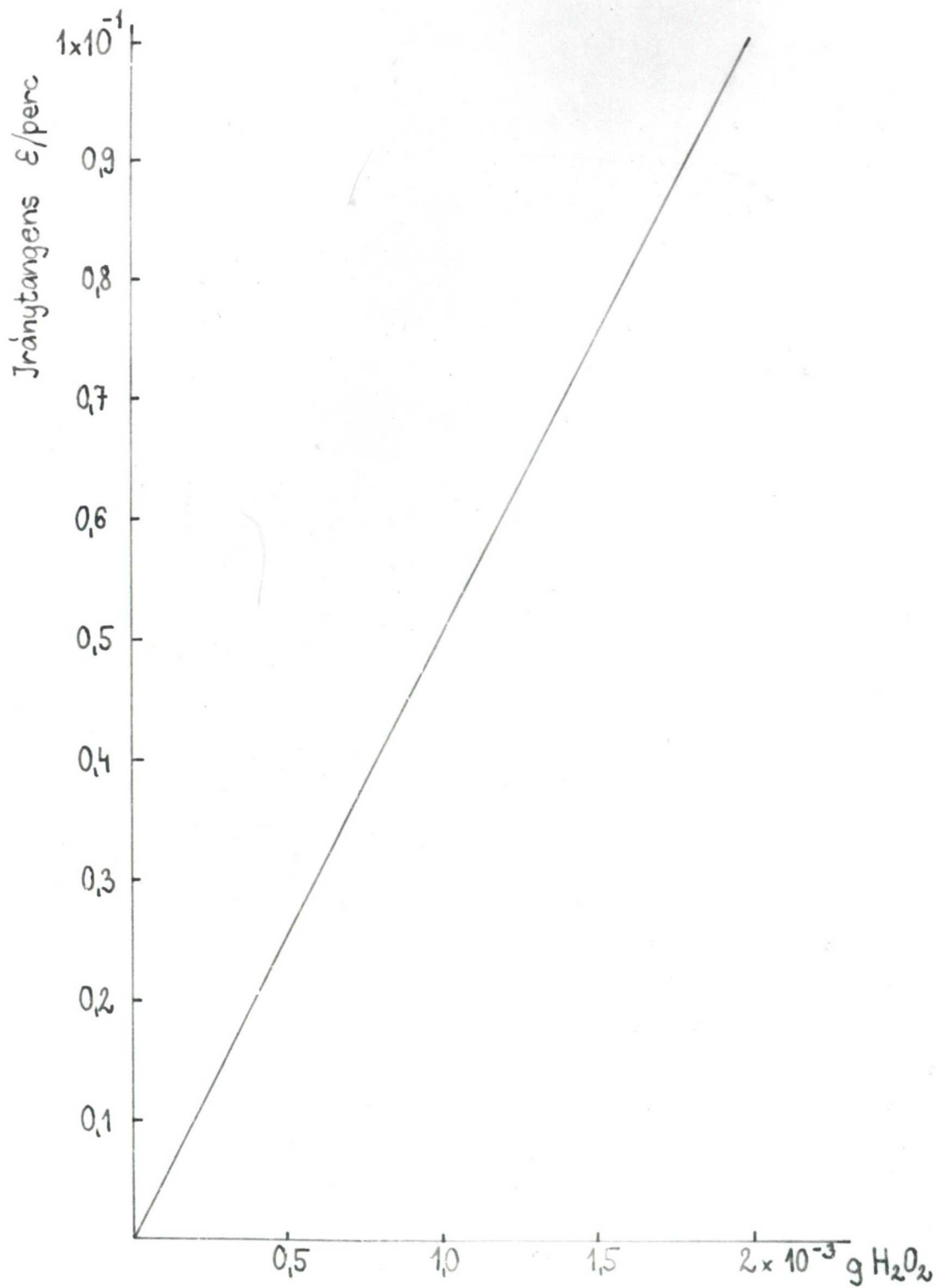
0,5 %-os tiobarbitursav 20 %-os triklórecet-savban készült oldata,

Alkalmazott mérőműszer: Spektromom 360 spektrofotométer.

A mérést 25 °C-on, 532 és 600 nm-nél, 1 cm-es üvegvettában végeztük. Az extinkciók kivonása után az eredményt grafikon segítségével értékeltük.

A méréshez májhomogenizátumot fiziológias sóoldattal 1:4 arányban higitottuk, majd a homogenizátumból 0,5 ml-t mérünk 4,5 ml puffer elegyhez, óvatos összekeverés után végeztük az inkubálást.

Az inkubálás ideje: 1,5 óra/37 °C-on. A kicsapó és a



1 Bergmeyer U = 1g H_2O_2 /perc 25°C-on

3. ábra

szinkifejlesztő reagens térfogata 5 ml. A végső színintenzitás 30 perc alatt 90 °C-on fejlődött ki.

7./ Szöveti A-vitamin meghatározás /20/.

Az A-vitamint máj szövetből a máj homogenizátum bemelegítése után lugos hidrolizissal szabadítottuk fel, majd etiléterrel extrahálva az oldószert vízfürdőn nitrogén áramban elpárologtatjuk. A maradék viktelenítése után a kloroformban oldott A-vitamint trifluoroecetsavval színreakcióba hoztuk és a színintenzitást spektrofotométeren mértük.

Anyagok: 5 %-os NaOH vizes oldata,
etiléter, kloroform,
vizmentes nátriumsulfát,
trifluoroecetsav 1:4 arányú kloroformos hígításban.

Alkalmazott mérőműszer: Spektromom 360-as spektrofotométer.

A mérést 25 °C-on, 620 nm-nél, 0,5 cm-es üvegvüvetta-ban végeztük. Az eredményt grafikon segítségével értékeltük.

A méréshez 1 g májhomogenizátumot vízfürdőn addig melegítettünk 5 %-os NaOH-al, míg homogén oldatot nem kaptunk. Az oldatot lehűlés után 50 ml etiléterrel rázóüvegsérben 2x extraháltuk, majd az extraktumot 2x mostuk 5-5 ml desztivizzel, a fázisok szétválasztása után az etilétert vízfürdőn nitrogén ráfuvatással távolítottuk el. Az éter viktelenítése vizmentes nátriumsulfáttal történt az elpárologtatás előtt. Ezután a maradékot kloroformban a várható vitamintartalomtól függően 2,5-10 ml-re feltöltjük. A fotometrá-láshoz az üvegvüvetta-ba 0,05-0,5 ml-t mérünk a vitamintartalomtól függően és magában a küvetta-ban hozzuk létre a színreakciót trifluoroecetsavval. A kifejlődött szint 30 mp múlva leolvastuk.

8./ A-vitamin hiányos kísérleti patkány felnevelése /21/

Célszerűen a vitaminhiány létrehozására használt patkányokat a szoptatás után elválasztjuk és A-vitamin mentes diétás étkezésre fogjuk. Ilyen esetben az anyától átvett A-vitamin tartalék rövid idő után eltűnik a májból /3 hetes patkányoknál/.

A továbbiakban a patkányoknak a következő diétát adjuk:

Kazein	10 %
Oleum helianthi	5 %
Élesztő	5 %
Rétesliszt	69 %
Vitaminok /E, D, K/ és ásványi sók	
Ca, Mg, Na/	1 %
Víz	10 %
	<hr/>
	100 %

Számos közlemény számol be a retinolsav A-avitaminózist előidéző hatásáról, amelyek a kísérleti állatnak 5-50 mikrogramm adagban adva naponta /23/ a patkány jól növekszik, de az A-avitaminózisa gyorsan kialakul. A retinolsavból 0,5 mikrogramm elégtelen, míg 500 mikrogramm toxikus.

Kísérleteinkben a fent leírt diétához 10 mikrogramm/nap/állat retinolsavat adagoltunk.

Kísérleti állatként CFY törzsből származó fehér patkányt használtunk.

A kísérleti állatok sálya normál étrenden:

4 hónap után	240-260 g
6 hónap után	250-300 g

között volt.

Az A-avitaminózisos patkányoké viszont

6 hónap után	200-220 g közé
--------------	----------------

esett. A patkányokon az A-avitaminózis összes tünete megfigyelhető volt.

9./ A-vitamin túlsúly előállítása egyszeri orális adaggal /24/.

Az irodalomból ismert /20/, hogy a májban lévő A-vitamin tartalék 1,5-2 évig is fenntarthatja a szervezetben a plazma normális A-vitamin szintjét, még az esetben is, ha a kísérleti állatot A-vitamin mentes diétán tartjuk. Csak a tartalék eltűnése után csökken le a plazma vitamin szintje. A-vitamin túlsúlyt kísérletünkhöz az alábbiak szerint hoztunk létre.

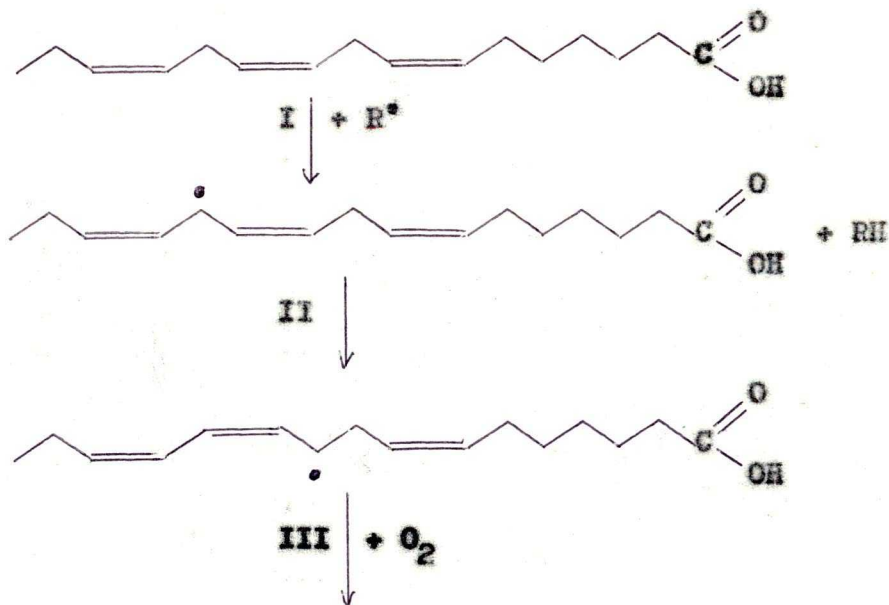
Normál étrenden felnevelt patkánynak p.o.-an 2000 NE/100 g A-vitamin készítményt /EGYÉ 100.000 NE tartalmú olajos injekció/ adagoltunk és kimértük a felszívódási csúcsértéket plazmában. 3-4 óra között az eredeti szint 6-8-szoros növekedést mutatott, amely idővel természetesen csökkent. Kísérleteinkben a fenti módon kezelt állatot a felszívódási csúcs idején mérgeztük foszforsavészterekkel.

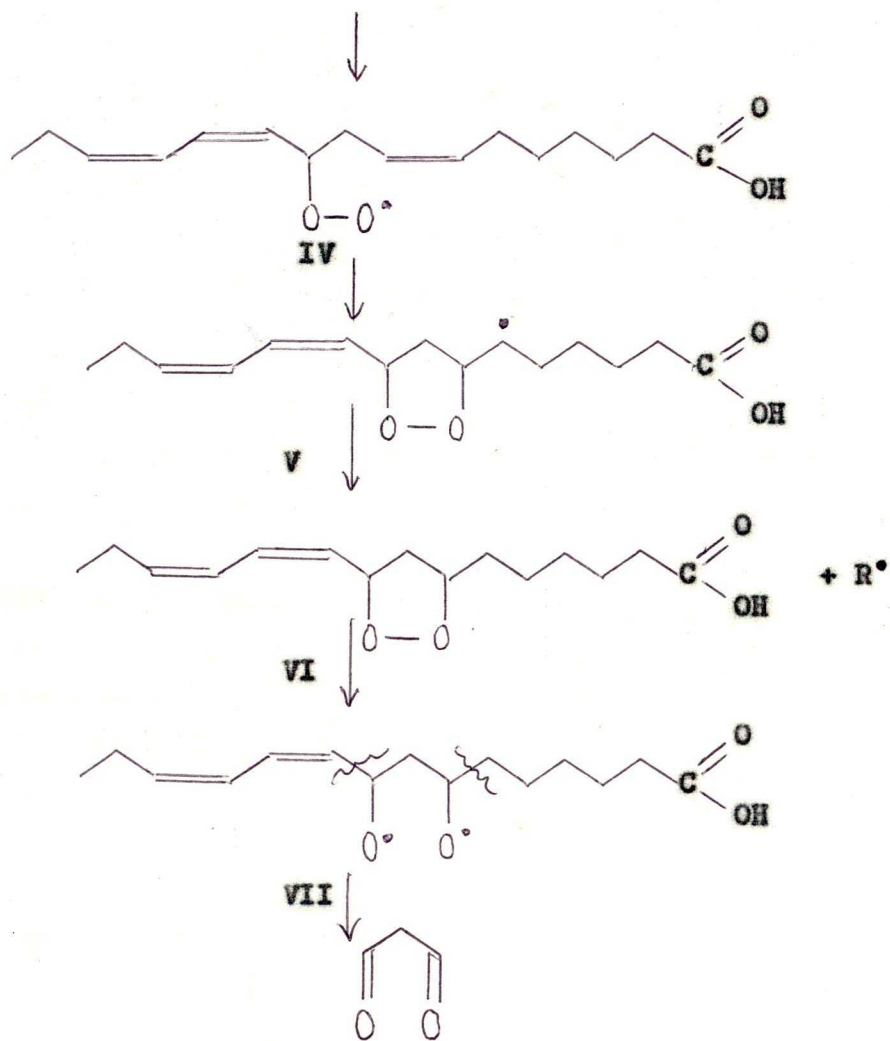


III. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.

Mivel a lipid peroxidáció mechanizmusával korábban nem foglalkoztunk, az általunk vizsgált probléma állását itt vezetnénk be néhány szóban.

A szabad gyökök, amelyek a lipid peroxidációval szoros kapcsolatba állíthatók, olyan molekulárszek, amelyek egy párosítatlan elektront tartalmaznak /következőkben: R[•]/. Ezek a gyökök nagy reakcióképességük miatt képesek minden biológiai anyagot károsítani, mivel a biológiai anyagok széles skálájú telítetlen lipideket, vagy többszörösen telítetlen vegyületeket tartalmaznak, különösen a sejt- és sejtorganeliumok membránjai és ezek a gyökökkel könnyen reagálnak. A szabad gyökök támadáspontjai főleg a 18:3 linolensavat és a 20:4 arachidonsavat tartalmazó foszfolipidek /25/. Megállapítottuk, hogy a patkányok májának mitokondriális és lizoszomális membránjai és az endoplazmás retikulum tekintélyes mennyiségben tartalmaz telítetlen zsírsavakat /26, 27/, ezek a következő képletsorban megadott módon reagálnak a telítetlen zsírsavakkal. A leírt reakciósor végeredménye lesz az a malondialdehid, amit a lipid peroxidáció során mennyiségileg mérünk.





malondialdehid

Látható, hogy a telítetlen zsírsav, de általában a poliének úgy reagálnak az R^\bullet gyökkel, hogy első lépésben 1 protont hasítanak ki a molekulából, amit kettős-kötés átrendeződés követ /II. reakció/ és molekuláris oxigén felvétel /III. reakció/. Az öttagú, két oxigén tartalmú gyűrű kialakulás /IV. reakció/ vezet majd a C-C kötés felszakadáshoz és végül malondialdehid képződéshez.

Niehaus és mtsai /25/ bizonyították, hogy a lipid peroxidáció a máj mikroszómákban NADPH függő enzimatisus folyamat és megállapították, hogy olyan esetben, ha lipid

mintákat NADPH-val inkubáltak, az arachidonát relatív koncentrációja 50 %-al csökkent. Feltehető, hogy az R[•] gyök is mikroszómákban keletkezik és a szabad gyök a továbbiakban a májban induktorként szerepelhet.

Ezen általános bevezetés után táblázatosan bemutatjuk eredményeinket.

A táblázatokban a kísérleti körülményeket is részleteztük.

Az 1. táblázat a kontrolokkal szemben bemutatja a patkány májak kolineszteráz aktivitását.

Fontos megfigyelésünk ebben az esetben az, hogy az A-vitamin túlsúly TRIKLORFONNÁL képes a szer kolineszteráz bénító hatását kompenzálni és a SUMITHION mérgezésnél - bár kisebb mértékben - de mérsékelni.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy normál körülmények között milyen mértékű a májban létrejövő endogén peroxidáció, amely Slater-Sawyer /29/ szerint normál körülmények között is bekövetkezik. Ezen cél érdekében mind a 4 hónapos, mind a 6 hónapos életkorú patkányok máj homogenizátumából malondialdehidet határoztunk meg, hogy későbbiekben ezen értékhez hasonlíthassuk eredményeinket. Eredményeinket a 2., 3. táblázatban foglaljuk össze.

A 4 hónapos patkányoknál 4,6 nMol malondialdehid/g májszövet értékkel szemben a 6 hónapos patkányok máj homogenátumában 7,5 nMol malondialdehid/g máj értékeket mértünk. Megállapítható tehát, hogy az életkor előrehaladásával növekszik az endogén peroxidáció. A különbség 63,6 %. Főleg ennek tudható be, hogy további intoxikációs kísérleteinket egy típusú 6 hónapos patkányokkal végeztük.

Ami ugyancsak szembeötlő első megtekintésre a két táblázatból /lásd a 2., 3. táblázatot/, hogy az SOD értékek is az öregedés során igen lényeges eltérést mutatnak. Tehát a korrallal a patkány szövetek SOD aktivitása jelentősen csökken.

1. Táblázat

Patkány máj kolineszteráz aktivitás változás.

1 E = 1 mikrom/szubsztrát / g / perc

Jelölés: K /normál kontrol/

D /A-avitaminózis kontrol/

T /TRIKLORFON: 150 mg/kg mérgezés után 150°
aktivitás/

S /SUMITHION: 800 mg/kg mérgezés után 240° akt./

D_T /A-avitaminózis + 150 mg/kg TRI mérgezés
után 150°-el aktivitás/

A_T /A-túlsúly + 150 mg/kg TRI mérgezés után
150°-el aktivitás/

D_S /A-avitaminózis + 800 mg/kg S mérgezés után
240°-el aktivitás/

A_S /A-túlsúly + 800 mg/kg S mérgezés után
240°-el aktivitás/

Sorszám	Jelölés	E /egység/	%-os csökkenés/ emelkedés K-hoz viszonyítva
1	K	2,36	-
2	D	1,18	- 50 %
3	T	1,05	- 56 %
4	S	1,02	- 57 %
5	D _T	0,57	- 76 %
6	A _T	2,74	+ 16 %
7	D _S	0,39	- 84 %
8	A _S	0,55	- 77 %

2. Táblázat

Normál étrenden tartott Kontrol nőstény patkányok májszövetének malondialdehid-koncentrációja.

Sorszám	Jelölés	Malondialdehid /nMol/g májszövet/
1	K ₁	3,60
2	K ₂	4,80
3	K ₃	5,20
4	K ₄	3,60
5	K ₅	5,20
6	K ₆	4,40
7	K ₇	5,20

Megjegyzés: A patkányok életkora: 4 hónap

$$\overline{SOD} \text{ /U/g n. sz.} = 13.400 \pm 3.400$$

$$\overline{\text{Prot.}} \text{ mg/g} = 125,3 \pm 5,3$$

$$\overline{SOD} \text{ U/mg} = 108,6 \pm 51,1$$

$$\bar{K} = 4,6 \pm 0,6$$

3. Táblázat

Normál étrenden tartott Kontrol nőstény patkányok májszövetének malondialdehid-koncentrációja.

Sorszám	Jelölés	Malondialdehid /nMol/g májszövet/
1	K ₈	7,20
2	K ₉	7,36
3	K ₁₀	7,36
4	K ₁₁	8,0

Megjegyzés: A patkányok életkora: 6 hónap

$$\bar{K} = 7,5 \pm 0,2$$

$$\overline{SOD} \text{ U/g} = 8.600 \pm 300$$

$$\overline{\text{Prot.}} \text{ mg/g} = 113 \pm 19$$

$$\overline{SOD} \text{ U/mg} = 78,8 \pm 15,9$$

Az A-vitaminnak, mint membrán protektív anyagnak jelentős szerepet tulajdonítanak. Ezért olyan kontrol vizsgálatokat végeztünk, amely bizonyítja ezen feltételezésünket. A-vitamin hiányban felnevelt illetve A-vitaminnal kezelt patkányoknál - mint második összehasonlító esetben - szintén elvégeztük előbbi kísérleteinket. Eredményeinket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Az endogén peroxidáció ezen esetekben nyilvánvalóan kivédődik, hiszen az A-avitaminózis patkányoknál kapott 8,7 nMol malondialdehid/g máj érték A-vitamin előkezelés hatására 4,8 nMol malondialdehid/g máj értékre csökken, ami 44,6 % csökkenésnek felel meg. Ha összevetjük ezen adatokat az első normál értékkel, a következő megállapításokat tehetjük.

1./ Az A-avitaminózis patkányok malondialdehidben mérhető endogén lipid peroxidációja 15,7 %-al magasabb, mint a normál esetekben.

2./ Az A-vitaminnal előkezelt patkányok endogén peroxidációja még a normál patkányokhoz képest is 19,6 %-al csökken bizonyítva, hogy az A-vitamin védőhatással rendelkezik a szabad gyökök okozta membrán károsító folyamatokra. Hasonló eredményre jutottak E-vitaminnal, mint antioxidánssal Tappel /30/, Shewin /27/ és Zsoldos és mtsai /28/. Megjegyezzük, hogy az E-vitaminnak, mint membrán-protektív anyagnak a védőmechanizmusa az utóbbi években tisztázódott, míg az A-vitamin hasonló funkciója jelenleg még kutatás tárgyát képezi. Az A-avitaminózisban és A-vitamin előkezelés után mért, fentiekben említett értékeket a 4. táblázatban foglaltuk össze az SOD értékekkel együtt /lásd a 4. táblázatot/.

Különböző máj károsító anyagokkal történt intoxikáció után /pl. CCl_4 / nem volt egységes felfogás abban, hogy mikor történjék az állat leölése, májának feldolgozása a mérgezés

4. Táblázat

A-vitamin hiányos / jelelés: D / és A-vitamin túl-
súlyba hozott / jelelés: A / növényi patkányok maj-
szövetének malondialdehid-koncentrációja.

Sorszám jelelés Malondialdehid
/nmol/g májszövet/

1	D ₁	8,80
2	D ₂	10,0
3	D ₃	7,20
4	A ₁	5,20
5	A ₂	4,40
6	A ₃	4,80

Megjegyzés: A patkányok életkora: 6 hónap

$$\bar{D} = 8,7 \pm 1,9$$

$$\text{SOD U/g} = 9,650 \pm 1,061$$

$$\text{Prot. mg/g} = 58 \pm 22$$

$$\text{SOD U/mg} = 208,8 \pm 87,9$$

$$\bar{A} = 4,8 \pm 0,3$$

$$\text{SOD U/g} = 9,200 \pm 300$$

$$\text{Prot. mg/g} = 246 \pm 12$$

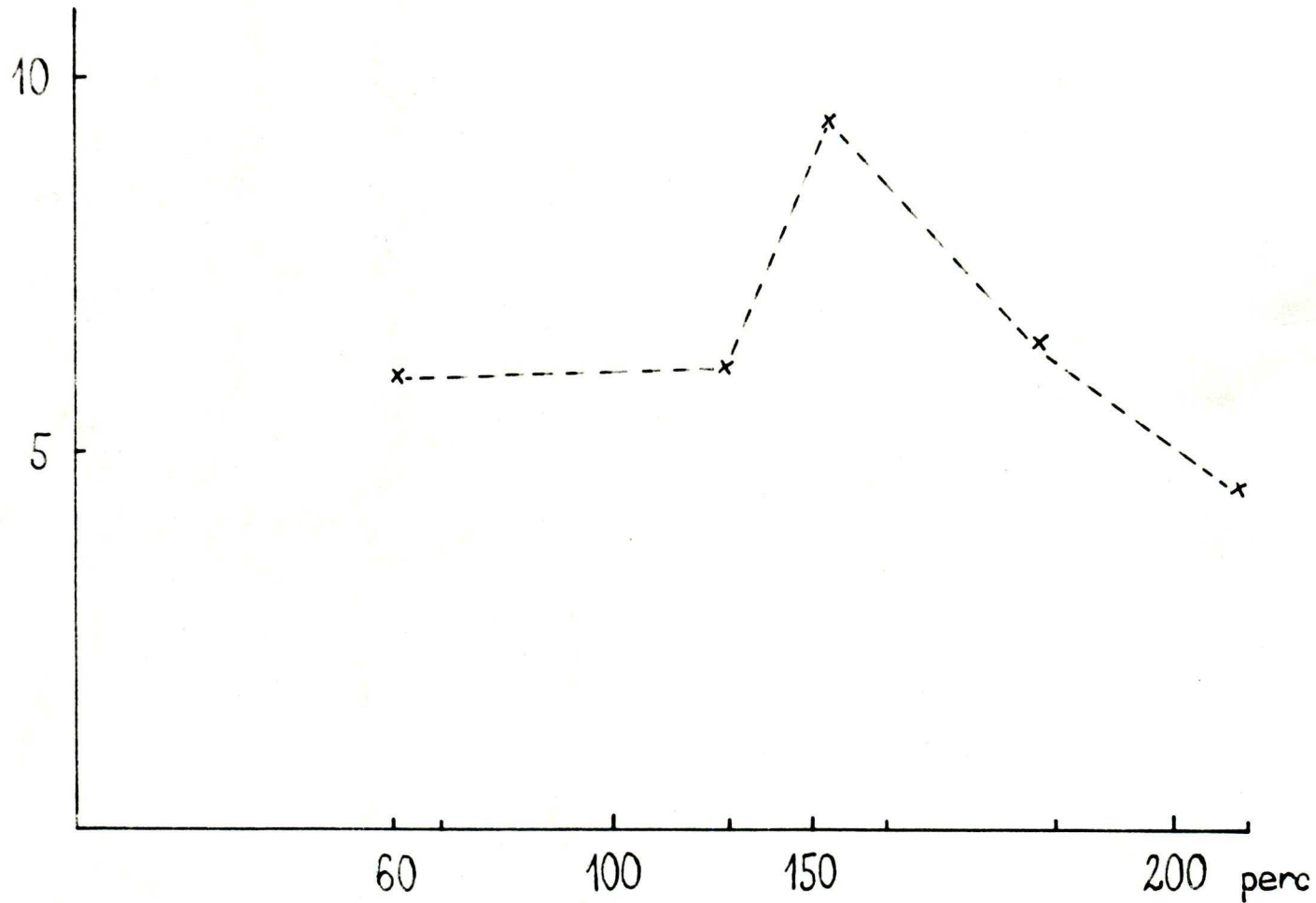
$$\text{SOD U/mg} = 37,6 \pm 3,1$$

után. Irodalmi adatok /28/ birtokában szükségesnek látszott az általunk használt, toxikusnak minősíthető anyag malondialdehid - idő függvényének felvétele. Az i.p. adott TRIKLORFON után az állatokat 60, 100, 120, 150, 180 és 240 perc után öltük le és dolgoztuk fel, majd mértük a máj homogenizátum malondialdehid koncentrációját. A 4. ábrán látható az a kinetikus görbe, amely azt mutatja, hogy egy kezdeti lassú felszívódási szakasz után, a malondialdehid koncentráció megnövekszik és a 150. percnél éri el a maximumát, majd közel exponenciálisan csökken. A minél pontosabb mérhetőség kedvéért további méréseinknél a 150. percet választottuk.

Az időkinetikának a 4. ábrán látható lefutását magyaráznunk kellett. Kérdésünk az volt, mi történik in vivo a malondialdehiddel a maximum elérése után? Tappel /30/, Chio et al. /31/ és Dillard et al. /32/ kimutatták, hogy az alifás dialdehidok, mint pl. a malondialdehid, képes reakcióba lépni olyan vegyületekkel, amelyek primér amino csoportokat tartalmaznak. Ilyenek a nukleinsavak vagy intermedierjeinek szabad primér amino-csoportjai, vagy a fehérjék, foszfolipidek és azok intermedierjeinek szabad amino-csoportjai. Ilyenkor Schiff-bázisok keletkeznek $/RN = CH - CH = CH - NH - R/$. Az említett Schiff-bázisok fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkeznek és az említett bázisok fluoreszcenciája a peroxidációval növekszik.

Mindezek után szükséges volt tisztázni, hogy a vizsgált két foszforsavészter, a TRIKLORFON és a SUMITHION, akut mérgezésnél milyen befolyást gyakorol az említett lipid peroxidációra. Ezen cél érdekében mind a normál, mind az A-avitaminózis és az A-vitaminnal előkezelt patkányokon elvégeztük előbbi vizsgálatainkat. Eredményeinket az 5.-8. táblázatban foglaltuk össze. A következőkben diszkutálni kívánjuk ezen eredményeinket. A viszonyítási alapok egyrészt a

Malondialdehyd
nMol/g



Normál étrenden tartott nőstény patkány májszövetének
malondialdehyd tartalma 150 mg/kg i.p. adott TRIKLORFON után
Megjegyzés: 4 hónapos patkány

4. ábra

normál, másrészt az A-avitaminózisos illetve A-vitaminnal előkezelt patkányok májhomogenizátumában mért malondialdehid átlagértékek voltak.

Az 5. táblázatból megállapítható, hogy normál patkányoknál a TRIKLORFON akut intoxikáció esetén a malondialdehid módszerrel mérhető lipid peroxidáció a normál értékekhez képest 226 %-al növekedett. Ugyanezen lipid peroxidációt a SUMITHIONNAL 212 %-al adódott többnek /lásd a 6. táblázatot/. Ez a normál értékhez viszonyított lényeges eltérés arra utal - bár az egymás közötti eltérés ebben az esetben figyelmen kívül hagyható - hogy ezen két anyag nagymértékű membrán foszfolipid károsodást idéz elő.

Ugyanakkor az is szembeötlő a táblázatokban /5., 6. táblázat/, hogy a két szer SOD szempontból más mechanizmussal hathat, mivel az egyik az SOD-t deprimálja, míg a másik növényvédőszer nem befolyásolja lényegesen a máj SOD értékeit.

Még itt kívánjuk megjegyezni, hogy a SUMITHION felszívódás kinetikáját nem mértük ki úgy, mint azt a TRIKLORFONNAL tettük, mivel a SUMITHION nem elegyedik vízzel. Ezt a problémát úgy oldottuk meg, hogy a SUMITHION-t intraperitoneálisan adtuk direkt nagy adagban és a hatásmechanizmusra csak a foszforészter általános hatásból következtettünk, remegés, megjelenése a kísérleti állaton, pupilla szűkület, stb. Kb. a felszívódás maximuma az i.p. alkalmazása után a 240. percre esett.

Érdekesnek ígérkeztek azok a vizsgálatok, amelyek direkt tanúsíthatják az A-vitaminnak, mint membrán-protéktív anyagnak szerepét. E célból akut intoxikációnak vetettük alá mind az A-avitaminózisos, mind az A-vitaminnal előkezelt patkányokat.

5. Táblázat

TRIKLORFON-nal mérgezett nőstény patkányok máj-szövetének malondialdehid-koncentrációja.

Sorszám	Jelölés	Malondialdehid /nMol/g májszövet/
1	T ₁	12,80
2	T ₂	14,0
3	T ₃	22,0
4	T ₄	13,60
5	T ₅	12,20

Megjegyzés: A patkányok életkora: 4 hónap

A mérgezés 150mg/kg TRIKLORFON-nal i.p. történt, vizes oldatot használva. A dekapitálás 150 perc múlva végrehajtva, feldolgozás 4 °C-on.

$$\bar{x} = 14,9 \pm 3,5$$

$$\overline{SOD} \text{ U/g} = 7.800 \pm 4.900$$

$$\overline{\text{Prot.}} \text{ mg/g} = 188,5 \pm 16,5$$

$$\overline{SOD} \text{ U/mg} = 39,5 \pm 22,5$$

6. Táblázat

SUMITHION-nal mérgezett nőstény patkányok máj-
szövetének malondialdehid-koncentrációja.

Sorszám	Jelölés	Malondialdehid /nMol/g májszövet/
1	S ₁	12,40
2	S ₂	13,20
3	S ₃	16,0
4	S ₄	14,40
5	S ₅	15,40

Megjegyzés: A patkányok életkora: 4 hónap

A mérgezés 800 mg/kg SUMITHION-nal i.p.
történt, közvetlenül a hatóanyagot injek-
tálva. Dekapitálás 240 perc múlva, fel-
dolgozás 4 °C-on.

$$\bar{S} = 14,3 \pm 1,8$$

$$\overline{SOD} \text{ U/g} = 9.700 \pm 1.500$$

$$\overline{\text{Prot.}} \text{ mg/g} = 90 \pm 74$$

$$\overline{SOD} \text{ U/mg} = 290$$

Egyrészt megállapítottuk, hogy az A-avitaminózisos patkányok endogén lipid peroxidációja 16 %-al magasabb a normál értéknél. Ez az eredmény már biztató volt arra nézve, hogy az A-vitaminnak szerepe van a sejt illetve a sejtalkotók membrán védelmében. Ezt alátámasztotta az is, hogy az A-vitaminnal előkezelt patkányok esetében az endogén peroxidáció 36 %-al csökkent.

A továbbiakban először akut TRIKLORFON mérgezésnél vizsgáltuk és hasonlítottuk össze az A-avitaminózisos és A-vitaminnal előkezelt patkányok máj homogenizátumát. A 7. táblázat eredményei azt mutatják, hogy a TRIKLORFON mérgezés megnöveli a malondialdehidben mérhető lipid peroxidációt, viszont az A-vitaminnal előkezelt patkányoknál ez a növekedés kisebb mértékű. Számszerűen, A-avitaminózisos patkányoknál a normál értékhez viszonyított lipid peroxidáció növekedés 42 %, míg az A-vitaminnal előkezelt patkányoknál ugyanez 18 % /lásd a 7. táblázatot/.

SUMITHION akut intoxikációnál viszont az előbbivel analóg esetekben, a 8. táblázat eredményei azt tanúsítják, hogy az A-avitaminózisos és A-vitaminnal előkezelt patkányoknál az eltérések nem olyan szignifikánsak. A normál értékhez viszonyított lipid peroxidáció változás 52 % volt az A-avitaminózisban felnevelt patkányoknál, viszont 60,4 % az A-vitaminnal előkezelt állatoknál.

A 7. és 8. táblázat feltünteti az SOD és fehérje értékeket is, amelyek a kontrolokhöz viszonyítva nem mutatnak lényeges eltérést.

A 9. táblázatban az általunk mért máj szövet és plazma A-vitamin értékeket mutatjuk be.

A táblázat adatai eléggé meggyőzőek ahhoz, hogy arról külön értékelést adjunk.

7. Táblázat

TRIKLORFON-nal mérgezett, előtte A-avitaminózisban felnevelt nőtény patkányok májszövetének malondialdehid-koncentrációja /Jelölés: D_T /.

TRIKLORFON-nal mérgezett és mérgezés előtt A-vitamin túlsúlyba hozott nőtény patkányok májszövetének malondialdehid-koncentrációja /Jelölés: A_T /.

Sorszám	Jelölés	Malondialdehid /nMol/g májszövet/
1	D_{T1} A_{T1}	12,0 7,60
2	D_{T2} A_{T2}	10,0 9,20
3	D_{T3} A_{T3}	9,20 9,04
4	D_{T4} A_{T4}	10,80 9,40
5	D_{T5} A_{T5}	11,0 9,0

Megjegyzés: A patkányok életkora: 6 hónap

A mérgezés 150 mg/kg TRIKLORFON-nak i.p. történt, vizes oldatot használva. A dekapitált /150 perc múlva a mérgezés után/ patkány szövetének feldolgozása 4 °C-on. A-vitamin túlsúlyt p.o. adott 2000 NE/100 g A-vitaminnal hoztuk létre, aminek felszívódási maximuma 3 óra múlva mérhető. Ebben az időpontban történt meg a mérgezés.

$$\bar{D}_T = 10,6 \pm 0,9$$

$$\overline{SOD} \text{ U/g} = 8.950 \pm 2.250$$

$$\overline{Prot.} \text{ mg/g} = 127 \pm 12$$

$$\overline{SOD} \text{ U/mg} = 70,4 \pm 14,4$$

$$\bar{A}_T = 8,8 \pm 0,9$$

$$\overline{SOD} \text{ U/g} = 7.100 \pm 1.122$$

$$\overline{Prot.} \text{ mg/g} = 129,5 \pm 9,7$$

$$\overline{SOD} \text{ U/mg} = 59,2 \pm 18,5$$



8. Táblázat

SUMITHION-nal mérgezett, előtte A-avitaminózisban felnevelt nőtény patkányok májszövetének malondialdehid-koncentrációja /Jelölés: D_S /.

SUMITHION-nal mérgezett és mérgezés előtt A-vitamin túlsúlyba hozott nőtény patkányok májszövetének malondialdehid-koncentrációja /Jelölés: A_S /.

Sorszám	Jelölés	Malondialdehid /nMol/g májszövet/
1	D_{S_1} A_{S_1}	12,20 10,0
2	D_{S_2} A_{S_2}	11,80 14,80
3	D_{S_3} A_{S_3}	10,40 10,80
4	D_{S_4} A_{S_4}	10,50 12,20
5	D_{S_5} A_{S_5}	12,00 12,20

Megjegyzés: A patkányok életkora: 6 hónap

A mérgezés 800 mg/kg SUMITHION-nal i.p. történt, közvetlenül a hatóanyagot injektálva. A dekaptált /240 perc múlva mérgezés után/ patkány szövetének feldolgozása 4 °C-on.

A-vitamin túlsúlyt p.o. adott 2000 NE/100 g A-vitaminnal hoztuk létre, aminek felszívódási maximuma 3 óra múlva mérhető. Ebben az időpontban történt a mérgezés.

$$\bar{D}_S = 11,4 \pm 0,8$$

$$\overline{SOD} \text{ U/g} = 7.075 \pm 4.800$$

$$\overline{Prot.} \text{ mg/g} = 153 \pm 44$$

$$\overline{SOD} \text{ U/mg} = 41,8 \pm 22$$

$$\bar{A}_S = 12 \pm 1,6$$

$$\overline{SOD} \text{ U/g} = 8.550 \pm 1.718$$

$$\overline{Prot.} \text{ mg/g} = 152,5 \pm 41,2$$

$$\overline{SOD} \text{ U/mg} = 59,2 \pm 24,3$$

9. Táblázat

Patkány máj és plazma A-vitamin értékek az általunk vizsgált esetekben.

	máj NE/g nedves szövet	plazma NE/100 ml
1. Irodalmi érték /patkánynál/	250	80
2. Általunk mért normál érték patkánynál	300 - 400	100
3. A-avitaminózisban	∅	20 - 25
4. 1 x nagy p.o. A-vit. adás után /3. órában/	nem mértük	700 - 800

IV. ÖSSZEFOGLALÁS.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy vizsgálataink során a következő megállapításokra jutottunk:

a./ Több szabadalomban szereplő eljárást dolgoztunk ki az inszekticidek egyik fontos csoportjának, a foszfátésztereknek szintézisére.

b./ A foszfátészterek közül két típusú észtert, a TRIKLORFON-t és a SUMITHION-t oatkány máj szöveten vizsgálat tárgyává tettük, hogy megkíséreljük megközelíteni az említett észter csoport molekuláris hatásmechanizmusát.

c./ Ismert az említett inszekticidek kolineszterázra gyakorolt hatása. Elvégeztük az általunk vizsgált összes körülmény befolyásának a vizsgálatát az általunk megválasztott esetekben.

Megállapítottuk, hogy az inszekticidek kolineszterázra gyakorolt gátló hatása kisebb-nagyobb mértékben - a vizsgálati körülményeink között - kompenzálható A-vitamin adagolással.

d./ Részletezve vizsgálataink megállapítottuk, hogy
1., a patkány szöveti lipid peroxidáció növekszik, viszont az SOD koncentráció csökken a patkány máj szövet korával.

2., Az említett két peszticid jelentősen fokozza az azonos korú és azonos körülmények között tartott és kezelt patkányok máj lipid peroxidációját.

3., Az A-avitaminózisban - a normális májhoz viszonyítva - a szöveti lipid peroxidáció növekszik.

Igy az A-avitaminózisos patkányok a normál patkányokhoz viszonyítva jó modelnek bizonyultak a peszticidek molekuláris hatásmechanizmusa tanulmányozására.

Felhasználva a fentieket és pillanatnyi A-hipervitaminózt hozva létre megvizsgáltuk az említett peszticidek

hatását.

e./ Megállapítottuk, hogy a két peszticid eltérő módon hat a patkány májra, mint első felszívódási egységre.

Amennyiben:

1., A TRIKLORFON kolineszterázra gyakorolt hatása A-vitaminnal könnyebben megfordítható, mint a SUMITHION hatása.

2., A TRIKLORFON aktívabb SOD gátló, mint a SUMITHION.

3., A TRIKLORFON az A-avitaminózis patkányokban kisebb hatást fejt ki a lipid peroxidációra, mint a SUMITHION.

Véleményünk szerint vizsgálatainkkal közelebb jutottunk az A-vitamin molekuláris hatásmechanizmusának a tisztázásában és néhány fontos adatot szolgáltatunk a foszfátészter peszticidek májra gyakorolt hatásmechanizmusának a tisztázásában.

V. IRODALOM.

1. Schrader, G.: BIOS Final Report. 714, /1947/.
2. Röchling, H., Büchel, K.H., Galley, R.A.E., Klein, W., Korte, F.: Chemie der Pflanzenschutz und Schädlingsbetzämpfungsmittel. pp. 121-215. Springer Verlag, Berlin, 1970.
3. Klein, W., Korte, F.: Chemie der Pflanzenschutz und Schädlingsbetzämpfungsmittel. pp. 119-120. Springer Verlag, Berlin, 1970.
4. Bán, M.; és mtsai: Személyes közlés.
5. Bán, M. és mtsai: Személyes közlés.
6. Bán, M., Laczkó, I., Mindszenty, L., Kocsis, S.J.: Magyar szabadalom. 158.369 /1970/.
7. Bán, M., Mindszenty, L., Mészáros, L., Kocsis, S.J.: Magyar szabadalom. 169.134 /1972/.
8. Ember, M., Mindszenty, L., Császár, L.: Tapasztalatok a DDVP gyártás során a kolineszteráz aktivitás és az A-vitamin anyagcsere károsodásról. Parazitológiai ankét, Sopron, 1970.
9. Ember, M., Mindszenty, L., Rengei, B., Császár, L., Czina, M.: Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., 3/1, 145-154 /1972/.
10. Arbusow, B.A., Organophosphorous Compounds. p. 307, Butterworths, London, 1964.
11. Cramer, F.: Angew. Chem. 72, 236 /1960/.
12. Wald, G., Proc. 13th Int. Physiol. Congr. Tokyo, 1965. and Symposia Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1965. pp. 69-79.
13. Seshardy Sastry, P., Ganguly, J.: Biochem. J., 80, 397-406 /1961/.
14. Connor, J.B., Wolf, G.: Vitamins and Hormones, 18, 457-482 /1960/.

15. Kahn, M.A.: Ann. Rev. Entomol., 14, 369-386 /1969/.
16. McLaren, D.S.: Trans. Roy. Soc. Med. Hyg., 60, 436-462 /1966/.
17. Lucy, J.A.: FEBS Letters, 3, 297-305 /1969/.
18. Matkovics, B., Novák, R., Hoang Duc Hanh, Suabó, L., Varga, Sz.I. Zalesna, G., Comp. Biochem. Physiol., 56/B, 31-34 /1977/.
19. Michel, H.O.: J.J. Lab. Clin. Med., 34, 1564-1568 /1949/.
20. Moore, T.: Vitamin A. Elsevier, Amsterdam, 1957.
21. Moore, T., Holmes, P.D.: Laboratory animals, 5, 239-250 /1971/.
22. Iván, J., Vass, K.: Szóbeli közlés.
23. Dowling, J.E.: Amer. J. of Clin. Nutrition, 9, 23-26 /1961/.
24. Iván, J., Vass, K., Mindszenty, L.: Nem közölt adat.
25. Niehaus, W.G., Samulesson, B.: Eur. J. Biochem., 6, 126-130 /1968/.
26. Slater, T.F.: Free radical mechanisms in tissue injury. Pion Ltd., London, 1972. pp. 29-31.
27. Sherwin, E.R.: J. Am. Orls Chem.Soc., 53, 430-436 /1976/.
28. Zsoldos, T., Tigyí, A., Montsko, T., Belágyi, J.: Magyar Biológiai Társaság Vándorgyűlése, Debrecen, 1976. aug. 26-28. pp. 184-186.
29. Slater, T.F., Sawyer, B.C.: Biochem. J. 123, 815-821 /1971/.
30. Tappel, A.L.: Ann. N.Y. Acad. Sci, 203, 12-28 /1972/.
31. Chio, K.S., Tappel, A.L.: Biochem., 8, 2821-2827 /1969/.
32. Dillard, C.J., Tappel, A.L.: Lipids, 6, 715-721 /1971/.

Dolgozatom végeztével köszönetet mondok Dr. Zsoldos Tibor
kandidátusnak munkámban nyújtott segítségéért, Novák Róbert-
nek kiegészítő méréseiért, Dr. Matkovics Béla egyetemi docens-
nek a felvetett problémáért és a megoldásban nyújtott segít-
ségéért, Dr. Szöllősi Istvánnának a dolgozat összeállítá-
sáért és mindazoknak akik a dolgozat összeállításában és a
kísérleti munkában a segítségemre voltak.

