

Anna Łukaszewicz-Hussain

STĘŻENIE GLUKOZY W SUROWICY KRWI W PODOSTRYM ZATRUCIU CHLORPYRIFOSEM – INSEKTYCYDEM FOSFOROORGANICZNYM

SERUM GLUCOSE CONCENTRATION IN SUBACUTE INTOXICATION WITH CHLORPYRIFOS – ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDE

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku / Medical University in Białystok, Białystok, Poland
Zakład Toksykologii / Department of Toxicology

STRESZCZENIE

Wstęp: Z badań epidemiologicznych wynika, że narażenie na pestycydy fosforoorganiczne zwiększa ryzyko zachorowania na niektóre choroby, m.in. neurologiczne (np. chorobę Parkinsona, chorobę Alzheimera) i układu krążenia, a także na cukrzycę. Celem niniejszej pracy była ocena stężenia glukozy w surowicy krwi szczurów przy podostrym zatruciu niskimi dawkami chlorpyrifosu – związku fosforoorganicznego stosowanego jako insektycyd. **Materiały i metody:** Badania wykonano na szczurach samcach szczepu Wistar, którym przez 14 lub 28 dni sondą dożołądkowo podawano raz dziennie roztwór olejowy chlorpyrifosu w dawce 0,2; 2 lub 5 mg/kg m.c./dzień. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały olej. W surowicy oznaczano stężenie glukozy metodą kolorymetryczną przy użyciu gotowych zestawów. **Wyniki:** Stwierdzono wzrost stężenia glukozy w surowicy po 14 dniach podawania chlorpyrifosu w najwyższej badanej dawce oraz po 28 dniach podawania związku we wszystkich badanych dawkach. **Wnioski:** Zarówno uzyskane wyniki (wzrost stężenia glukozy w surowicy krwi w podostrym zatruciu chlorpyrifosem), jak i dane z piśmiennictwa sugerują, że narażenie na insektycydy fosforoorganiczne może sprzyjać rozwojowi cukrzycy. U osób mających zawodowy kontakt z tymi związkami konieczne jest więc częstsze wykonywanie badań diagnostycznych w kierunku jej wczesnego wykrycia. Med. Pr. 2013;64(4):527–531

Słowa kluczowe: chlorpyrifos, glukoza, cukrzyca

ABSTRACT

Background: Epidemiological studies suggest that exposure to organophosphate insecticides enhances the risk of various diseases, including neurological disorders, e.g. Parkinson's or Alzheimer's disease, arteriosclerosis and diabetes mellitus. For this reason the aim of the presented study was to estimate serum concentration of glucose in subchronic intoxication with low doses of chlorpyrifos, an organophosphate insecticide. **Materials and Methods:** The rats received chlorpyrifos at a daily dose of 0.2, 2 or 5 mg/kg b.w./day for 14 or 28 days. For biochemical determinations of serum glucose in the rats ready-to-use kit was applied. **Results:** In subacute intoxication with chlorpyrifos the increased serum concentration of glucose was observed after 14 days of intoxication with the highest dose (5 mg/kg b.w.) and after 28 days of intoxication with all dose levels used. **Conclusions:** The results of this study showing the increased concentration of serum glucose in subacute intoxication with low doses of chlorpyrifos, as well as the literature data suggest that exposure to organophosphate insecticides can increase the risk of diabetes mellitus. It may thus be concluded that people occupationally exposed to these compounds should be subjected to diagnostic tests for early detection of diabetes. Med Pr 2013;64(4):527–531

Key words: chlorpyrifos, glucose, diabetes mellitus

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Anna Łukaszewicz-Hussain, Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2c, 15-222 Białystok, e-mail: anhussa@wp.pl
Nadesłano: 13 czerwca 2013, zatwierdzono: 21 sierpnia 2013

WSTĘP

Do zatruc pestycydami fosforoorganicznymi u ludzi dochodzi w wyniku ekspozycji zawodowej (stosowania tych związków w rolnictwie) oraz środowiskowej (zamieszkiwania w środowisku zanieczyszczonym tymi związkami lub wskutek ich przypadkowego spożycia) (1–3). Podstawowy mechanizm działania toksycznego tych związków to hamowanie w układzie nerwowym i krwinkach czerwonych aktywności acetylocholi-

noesterazy, która hydrolizuje acetylocholinę. Wywołuje to objawy zatrucia ostrego: muskarynowe, nikotynowe i ośrodkowe (1–4). U osób zatrudnionych w kontakcie z pestycydami fosforoorganicznymi jako marker narażenia na nie stosuje się oznaczanie aktywności cholinesterazy w surowicy (1).

W zatruciach ww. związkami dochodzi także do stresu oksydacyjnego, co obserwowano zarówno u ludzi, jak i w badaniach doświadczalnych prowadzonych na zwierzętach (2,3,5–7).

Z badań epidemiologicznych wynika, że narażenie na pestycydy fosforoorganiczne zwiększa ryzyko zachorowania na niektóre choroby, m.in. neurologiczne – chorobę Parkinsona lub chorobę Alzheimera – i choroby układu krążenia (1,8–10). Obserwuje się też wzrost częstości występowania cukrzycy, w tym cukrzycy typu 2, oraz zwiększenie liczby osób ze stanem przedcukrzycowym – nieprawidłowym poziomem glukozy na czczo lub jej nieprawidłową tolerancją (11–13). Za przyczynę wzrostu zachorowań na cukrzycę uważa się styl życia, dietę bogatą w tłuszcze, otyłość, a także czynniki występujące w środowisku, wśród których ważne miejsce zajmują pestycydy fosforoorganiczne – ze względu na częstość ich stosowania i ryzyko kontaktu z nimi (12,13).

Celem niniejszej pracy była ocena stężenia glukozy w surowicy krwi szczurów przy podostrym zatruciu niskimi dawkami chlorpyrifosu – związku fosforoorganicznego stosowanego jako insektycyd.

MATERIAŁY I METODY

Badania wykonano na 72 szczurach samcach szczepu Wistar (stado CRL: (WI)WUBR) o masie ciała 200–230 g, pochodzących z Hodowli Zwierząt Doświadczalnych w Brwinowie koło Warszawy. Zwierzęta karmione były granulowaną paszą standardową i pojone wodą *ad libitum*. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku (decyzja nr 23/2008).

Zwierzętom doświadczalnym przez 14 lub 28 dni sondą dożołądkowo podawano raz dziennie roztwór olejowy chlorpyrifosu (O,O-dietylo O-3,5,6-trichloro-2-pyridinylo tiofosforanu, numer CAS 2921-88-2) w dawce 0,2; 2 lub 5 mg/kg m.c./dzień. Zwierzęta z grupy kontrolnej w analogiczny sposób otrzymywały olej. Grupa kontrolna i badana liczyły po 9 szczurów.

Krew do badań biochemicznych, po uśpieniu zwierząt doświadczalnych przy użyciu Vetbutalu, pobierano przez punkcję dosercową, 24 godziny po podaniu ostatniej dawki badanego insektycydu fosforoorganicznego lub w przypadku grupy kontrolnej – oleju. Krew po uzyskaniu skrzepu wirowano przez 10 min przy obrotach 1000×g w celu otrzymania surowicy. W tak otrzymanej surowicy oznaczano stężenie glukozy metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawów produkcji BioSystems S.A. (Hiszpania). Stężenie glukozy w surowicy wyrażano w mg na 100 cm³ surowicy.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta, przyjmując różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

WYNIKI

Stwierdzono, że podanie zwierzętom doświadczalnym insektycydu fosforoorganicznego – chlorpyrifosu – powoduje istotny statystycznie wzrost stężenia glukozy w surowicy krwi. Wzrost ten obserwowano już po 14-dniowym podawaniu badanego insektycydu w najwyższej użytej dawce. Po 28 dniach podawania chlorpyrifosu statystycznie istotne wyższe stężenie glukozy w surowicy krwi obserwowano po podaniu związku w dawce 0,2; 2 i 5 mg/kg m.c./dziennie. W przypadku najniższych dawek wzrost ten wynosił ok. 20%, a w przypadku dawki 5 mg/kg m.c. – ponad 50% w stosunku do wartości grupy kontrolnej. W grupie szczurów otrzymujących chlorpyrifos w dawce 5 mg/kg m.c. wartości stężenia glukozy w surowicy krwi były także istotnie statystycznie wyższe od wartości obserwowanych w grupach szczurów otrzymujących chlorpyrifos w niższych dawkach (0,2 i 2 mg/kg m.c.) (tab. 1).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Hiperglikemia jest jednym z ważniejszych ubocznych skutków zdrowotnych powodowanych przez insektycydy fosforoorganiczne (12–15). Jak wynika z obserwacji różnych autorów (15–18), u ludzi ekspozowanych na te związki dochodzi do przejściowego wzrostu stężenia glukozy we krwi i do glikozurii, a więc objawów charakterystycznych dla osób, u których rozpoznano cukrzycę. Notowano też wzrost liczby przypadków śmiertelnych z powodu cukrzycy typu 2 u osób zatrudnionych w rolnictwie i stosujących insektycydy tej grupy w porównaniu z populacją generalną (16–18).

W niniejszej pracy w podostrym zatruciu chlorpyrifosem zaobserwowano wzrost stężenia glukozy w surowicy krwi szczurów już po 14 dniach podawania insektycydu w najwyższej dawce, a po 28 dniach wzrost stężenia glukozy powodowały już wszystkie stosowane dawki związku. Po podaniu chlorpyrifosu w dawce 5 mg/kg m.c./dzień stężenie glukozy po 28-dniowym podawaniu było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z krótszym okresem podawania insektycydu. Na uwagę zasługuje to, że chlorpyrifos podawano w niskich dawkach.

Akceptowane dzienne pobranie tego insektycydu drogą pokarmową u ludzi określono na 0–0,01 mg/kg m.c. Poziom narażenia ustalono na podstawie dawki 1 mg/kg masy ciała dziennie, która nie powoduje niekorzystnych skutków zdrowotnych u szczurów i przy zastosowaniu dla ludzi współczynnika bezpieczeństwa wyno-

Tabela 1. Stężenie glukozy w surowicy szczurów w podostrym zatruciu chlorpyrifosem
Table 1. Serum glucose concentration in subacute intoxication of rats with chlorpyrifos

Dawka chlorpyrifosu [mg/kg m.c.] Chlorpyrifos dose [mg/kg b.w.]	14 dni podawania 14 days of treatment		28 dni podawania 28 days of treatment	
	stężenie glukozy serum glucose concentration [mg/dl] M±SD	P	stężenie glukozy serum glucose concentration [mg/dl] M±SD	P
0,0	79,74±7,14		80,73±4,15	
0,2	83,36±9,18		100,73±5,43	P ₁₋₆ < 0,001 P ₅₋₆ < 0,001 P ₂₋₆ < 0,001
2,0	87,33±7,26		108,88±6,49	P ₁₋₇ < 0,001 P ₅₋₇ < 0,001 P ₃₋₇ < 0,001
5,0	106,73±2,74	P ₁₋₄ < 0,001 P ₂₋₄ < 0,001 P ₃₋₄ < 0,001	129,37±8,05	P ₁₋₈ < 0,001 P ₅₋₈ < 0,001 P ₇₋₈ < 0,020 P ₄₋₈ < 0,001 P ₆₋₈ < 0,010

M – średnia / mean; SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

p – istotne statystycznie / significantly different.

1 – grupa kontrolna / control group.

2 – grupa otrzymująca chlorpyrifos w dawce 0,2 mg/kg m.c. (14 dni) / group intoxicated with chlorpyrifos at a dose of 0.2 mg/kg b.w. (14 days).

3 – grupa otrzymująca chlorpyrifos w dawce 2 mg/kg m.c. (14 dni) / group intoxicated with chlorpyrifos at a dose of 2 mg/kg b.w. (14 days).

4 – grupa otrzymująca chlorpyrifos w dawce 5 mg/kg m.c. (14 dni) / group intoxicated with chlorpyrifos at a dose of 5 mg/kg b.w. (14 days).

5 – grupa kontrolna / control group.

6 – grupa otrzymująca chlorpyrifos w dawce 0,2 mg/kg m.c. (28 dni) / group intoxicated with chlorpyrifos at a dose of 0.2 mg/kg b.w. (28 days).

7 – grupa otrzymująca chlorpyrifos w dawce 2 mg/kg m.c. (28 dni) / group intoxicated with chlorpyrifos at a dose of 2 mg/kg b.w. (28 days).

8 – grupa otrzymująca chlorpyrifos w dawce 5 mg/kg m.c. (28 dni) / group intoxicated with chlorpyrifos at a dose of 5 mg/kg b.w. (28 days).

szącego 100 (13,19,20). Dawki użyte w niniejszej pracy są więc niższe od akceptowanego dziennego pobrania (najniższa zastosowana dawka) lub 2- i 5-krotnie od niej wyższe.

Z przeprowadzonych badań wynika, że podawanie szczurom przez 28 dni chlorpyrifosu już w najniższej użytej do badań dawce – czyli 0,2 mg/kg m.c./dzień – doprowadza do niewielkiego, ale istotnego statystycznie wzrostu stężenia glukozy w surowicy.

Z badań epidemiologicznych wynika, że wiele pestycydów fosforoorganicznych powoduje zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (2,8,10). Również badania prowadzone na zwierzętach doświadczalnych wskazują, że zarówno w ostrych, jak i przewlekłych zatruciach tymi związkami zmienia się aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenie nieenzymatycznych antyoksydantów (2,5-7). Zmiany takie w wątrobie szczurów obserwowano m.in. w badaniach prowadzonych na takim samym modelu doświadczalnym jak przyjęty w niniejszej pracy (6).

Z badań innych autorów wynika, że w ostrym zatruciu diazinonem zmianom aktywności peroksydazy

glutationowej w wątrobie towarzyszył wzrost uwalniania glukozy z tego narządu, a między jej aktywnością w wątrobie a stężeniem glukozy w surowicy istnieje dodatnia korelacja (21). Zdaniem niektórych autorów efektem ekspozycji na insektycydy fosforoorganiczne jest uszkodzenie trzustkowych wysepek Langerhansa i zaburzenie wydzielania insuliny oraz indukcja produkcji glukozy w wątrobie (2,15).

Jak już pisano wyżej, w zatruciach insektycydami fosforoorganicznymi dochodzi do stresu oksydacyjnego (2,5,21). Obserwowano to także w podostrym zatruciu chlorpyrifosem, zarówno w wątrobie, jak i w mózgu szczurów (6,7).

W stresie oksydacyjnym następuje zmiana aktywności enzymów antyoksydacyjnych, w tym peroksydazy glutationowej. Enzym ten w swoim działaniu zużywa glutation zredukowany (reduced glutathione – GSH), który przechodzi w formę utlenioną (glutathione disulfide – GSSG). Żeby powtórnie doszło do przejścia GSSG w GSH, komórki wykorzystują reduktazę glutationową. Enzym ten potrzebuje zredukowanej formy fosforanu nikotynamidoadeninowego (nicotinamide adeni-

ne dinucleotide phosphate – NADPH) jako substratu, którego źródłem jest szlak pentozofosforanowy. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa katalizuje pierwszy etap tego szlaku, utlenia glukozy-6-fosforan do kwasu glukonowego i redukuje fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – NADP) do NADPH+H⁺ (2,22).

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa do swojej aktywacji potrzebuje glukozy (2,15). Tak więc glukoza jest źródłem równoważników redukcyjnych – NADH i NADPH – które uczestniczą w przejściu utlenionych komórkowych antyoksydantów (GSSG) w formę zredukowaną. Wzrost stężenia glukozy z jednej strony może zwiększać zdolności antyoksydacyjne organizmu narażonego na działanie insektycydów fosforoorganicznych, a z drugiej – prowadzić do glikacji białek, w której wyniku tracą one swoją strukturę i funkcję (15,16). W cukrzycy mamy do czynienia także z autooksydacją glukozy (glikooksydacją) – w jej wyniku powstają reaktywne aldehydoketony nasilające wspomniany proces nieenzymatycznej glikacji białek, a w trakcie tego procesu powstają liczne toksyczne pochodne tlenu (23).

WNIOSKI

Zarówno wyniki uzyskane w niniejszej pracy (tj. wzrost stężenia glukozy w surowicy krwi w podostrym zatruciu chlorpyrifosem), jak i cytowane dane z piśmiennictwa sugerują, że narażenie na insektycydy fosforoorganiczne może sprzyjać rozwojowi cukrzycy. Konieczne więc wydaje się częstsze wykonywanie badań diagnostycznych w kierunku wczesnego rozpoznania cukrzycy u osób mających zawodowy kontakt z tymi związkami.

PIŚMIENNICTWO

1. Łukaszewicz-Hussain A.: Narażenie zawodowe i środowiskowe na insektycydy fosforoorganiczne. Wskaźniki narażenia i skutki zdrowotne – przegląd piśmiennictwa. *Med. Pr.* 2007;58(4):345–351
2. Łukaszewicz-Hussain A.: Role of oxidative stress in organophosphates insecticide toxicity – short review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2010;98(2):145–150, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.006>
3. Vidyasagar J., Karunakar N., Reddy M.S., Rajnarayana K., Surender T., Krishna D.R.: Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian J. Pharmacol.* 2004;36:76–79
4. Lotti M.: Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. W: Krieger R.I., Krieger W.C. [red.]. *Handbook of Pesticide Toxicology*. Wyd. II. Academic Press, San Diego (USA) 2001, ss. 1043–1086, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012426260-7/50054-9>
5. Sharma Y., Bashir S., Irshad M., Gupta S.D., Dogra T.D.: Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicology* 2005;206:49–54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.062>
6. Łukaszewicz-Hussain A.: Involvement of oxidative stress in liver injury after subchronic intoxication with low doses of chlorpyrifos – study on rats. *Cent. Eur. J. Med.* 2013;8(1):132–139, <http://dx.doi.org/10.2478/s11536-012-0100-2>
7. Łukaszewicz-Hussain A.: Activities of brain antioxidant enzymes, lipid and protein peroxidation. *Cent. Eur. J. Med.* 2011;6(5):588–594, <http://dx.doi.org/10.2478/s11536-011-0065-6>
8. Petrovitch H., Ross W., Abbott R.D., Sanderson W.T., Sharp D.S., Tanner C.M. i wsp.: Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Arch. Neurol.* 2002;59:1787–1792, <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.59.11.1787>
9. Mates J.M., Perez-Gomez C., de Castro I.N.: Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 1999;32:595–603, [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00075-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00075-2)
10. Abdollahi M., Rainba A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A.: Pesticide and oxidative stress: A review. *Med. Sci. Mon.* 2004;10:RA141–RA147
11. Sieradzki J.: *Cukrzyca*. Wydawnictwo Medyczne Viamedica, Gdańsk 2007
12. Łukaszewicz-Hussain A.: Wpływ pestycydów fosforoorganicznych na trzustkę. *Med. Pr.* 2011;62(5):543–550
13. Rezg R., Mornagui B., El-Fazaa S., Garbi N.: Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2010;21:345–357, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.006>
14. Kamath V., Rajini P.S.: Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. *Toxicology* 2007;231:137–146, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.072>
15. Rahimi R., Abdollahi M.: A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2007;88:115–121, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.10.003>
16. Moatamedi A.R., Anand C.V.: Glycosuria in organophosphate and carbamate poisoning. *J. Assoc. Physicians India* 2003;51:91–98
17. Montgomery M.P., Kamel F., Saldana T.M., Alavanja M.C., Sandler D.P.: Incident diabetes and pesticide exposu-

- re among licensed pesticide applicators: Agricultural health study, 1993–2003. *Am. J. Epidemiol.* 2008;167(10): 1235–1246, <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwn028>
18. Beard J., Sladden T., Morgan G., Berry G., Brooks L., McMichael A.: Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers. *Environ. Health Perspect.* 2003;111(5):724–730
19. Tomlin C.D.S.: *The pesticide manual. A world compendium.* Wyd. 14. British Crop Protection Council, Alton, Hampshire (UK) 2006, ss. 186–187
20. FAO Specifications and evaluations for agricultural pesticides. Chlorpyrifos. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva 2006
21. Teimouri F., Amirkabirian N., Esmaily H., Mohammadi-rad A., Aliahmadi A., Abdollah M.: Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress. *Hum. Exp. Toxicol.* 2006;25:697–703, <http://dx.doi.org/10.1177/0960327106075064>
22. Gerard-Monier D., Chaudiere J.: Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol. Biol.* 1996;44: E209–E214
23. Mrowicka M.: Znaczenie zaburzeń układu prooksydacyjno-antyoksydacyjnego dla etiopatologii cukrzycy. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2011;65:534–541, <http://dx.doi.org/10.5604/17322693.956085>