

Zárójelentés a T 042966 sz.

Különböző kémiai szerkezetű peszticid hatóanyagok – szerves foszfát, piretroid, karbamát, klórozott szénhidrogén, tercier-aromás-triamin – és kombinációik által kiváltott neuro-, magatartás- és immuntoxikológiai hatások vizsgálata állatkísérletes modellekben

című OTKA pályázatról

Napjainkban a kártevők elleni védekezés kémiai peszticideken alapul, melyek közül számos – így pl. a legtöbb rovarölő hatóanyag –, veszélyt jelent az állati és az emberi szervezetre is. Jelen munkában négy különböző peszticid csoportba (organofoszfátok, karbamátok, piretroidok és formamidinek) tartozó egy-egy hatóanyag hatását vizsgáltuk azonos kísérleti feltételek között, az alábbi dózisokban:

Szerves foszforsav észter: dimethoát (**D**) – per os LD₅₀ = 704 mg/kg

1/5, 1/25, 1/100 LD₅₀ – 140,8; 28,2; 7,4 mg/kg

Karbamát: propoxur (**P**) – per os LD₅₀ = 85,0 mg/kg

1/5, 1/25, 1/100 LD₅₀ – 17,0; 3,4; 0,85 mg/kg

Piretroid: cipermetrin (**C**) – per os LD₅₀ = 554 mg/kg

1/5, 1/25, 1/100 LD₅₀ – 110,8; 22,2; 5,54 mg/kg

Tercier-aromás-triamin: amitráz (**A**) – per os LD₅₀ = 529 mg/kg

1/5, 1/25, 1/100 LD₅₀ – 105,8; 21,2; 5,3 mg/kg

Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy különböző kémiai szerkezetű – szerves foszfát, karbamát, piretroid, klórozott szénhidrogén, tercier-aromás-triamin – növényvédőszer hatóanyagok különböző dózisaik önálló, illetve egymással történő kombinációs, szubkrónikus bevitelére hogyan befolyásolja a felnőtt patkányok immunrendszerének és/vagy központi és perifériás idegrendszerének működését, valamint, hogy ugyanezen anyagmennyiségek az intra- és extrauterin egyedfejlődés különböző szakaszaiban adva milyen hatással bírnak az idegrendszer működésére.

A vizsgált inszekticidek jellemzői, a makro- és mikro környezetben történő jelenléte, és alkalmazásuk módjai valószínűvé teszik a velük való többszörös, illetve szimultán expozíciót, mely az emberi szervezetben azok egyidejű jelenlétét és kombinált effektusát eredményezheti. Az egyes rovarirtó hatóanyagok toxicitásáról számos információ áll rendelkezésre, kombinált hatásokról az irodalomban keveset közöltek. Ez az ismerethiány az elmúlt években olyan új kutatási irányok megjelenéséhez vezetett, mint a kombinációs hatások megjelenésének esélye, és az ebből adódó kockázatok elemzése. Vizsgálataink során a kombinációs adagolás alkalmazásával a tényleges foglalkozási és/vagy környezeti expozíciók okozta folyamatok elemzését kívántuk elvégezni.

A kísérleteinkhez Wistar patkányokat használtunk. A vizsgálatok során felhasználásra kerülő állatok intézetünk akkreditált állatházában voltak elhelyezve, ahol tartási körülményeik a megengedett konvencióknak: 12-12 órás fény-sötétség ciklus, hőmérséklet 20-22 °C, páratartalom 50-60 %. A patkányok standard tápot és inni *ad libitum* csapvizet kaptak.

A központi idegrendszer működésének eltéréseit a spontán és kiváltott kérgi aktivitás egyes paramétereinek mérésével – az elsődleges kérgi szenzoros központokról elvezetett elektrokortikogramok (ECoG), a szomatoszenzoros (SS), vizuális (VIS) és auditív (AUD) kiváltott potenciálok (KP) elemzésével – vizsgáltuk. A perifériás

idegrendszerre gyakorolt hatást a vezetési sebesség és az abszolút és relatív refrakter idők mérésével állapítottuk meg.

Az anyagok és kombinációik immunfunkciókra kifejtett hatásait a lép hemolitikus IgM-plakk képző sejtszámának (PFC) meghatározásával és a késői túlérzékenységi reakcióval vizsgáltuk.

A kapott adatok analízisével arra kerestük a választ, vannak-e olyan érzékeny, jól reprodukálható paraméterek, melyek alkalmasaknak mutatkoznak egyes peszticidek, illetve kombinációik korai neuro-, magatartás és immuntoxikus hatásainak detektálására, s amelyek humán extrapolálással a populációs expozíció megállapítására és követésére is használhatók lennének.

A ténylegesen elvégzett vizsgálatok – az eredetileg rendelkezésre álló pénzüsszeg redukciója következtében – a benyújtott és elfogadott tervhez képest kisebb programként kerültek elvégzésre. A hatóanyagok közül kimaradt a klórozott szénhidrogének közé tartozó lindán, a metodikák közül pedig a magatartási vizsgálatok és a populációs spike regisztrálása. A tervezetthez képest csökkentett mértékű finanszírozás az említett vizsgálatok elvégzését ugyanis nem tette lehetővé.

Funkcionális neurotoxikus hatások akut kezelést követően

Az elektrofiziológiai kísérletek során akut, 24 órás hatásokat is vizsgáltunk. Ennek elsődleges célja az volt, hogy a szubkrónikus, illetve egyedfejlődés alatti kezelési módokhoz kiválasszuk a kifejezettebb elváltozásokat okozó kombinációkat.

Az 1/5 LD₅₀ dózisú inszekticidek akut beadását követően a delta és a béta hullámkomponensekben mindhárom kérgi területen csökkenés volt megfigyelhető a **D** és az **A** hatására; az **A** csökkentette a theta és alfa komponenseket is. A **P** hatása ellentétes volt a **D** hatásával, míg a **C** nem hozott létre különösebb változást az ECoG-ban. A kettős kombinációkban szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a gyors hullámú komponenseknél. A hármas és a négyes kombinációk hatása ettől eltérő volt, a **DPC** növekedést okozott a gyors aktivitásban, a **DP**, **DC** és **PC** viszont nem. **DCA**, és még inkább a **DPCA**, hasonló hatású volt. Az alacsonyabb 1/100 LD₅₀ dózisonál nem volt megfigyelhető változás, és az 1/25 LD₅₀ dózisú kezelésnél is csak a **DPCA** hozott létre szignifikáns eltérést.

Az inszekticidek önállóan adva kevésbé hatottak a kérgi KP-kra: kissé növelték a latenciát (főleg a **D** és az **A**), és csökkentették az időtartamot. A kettős kombinációk hatása kifejezettebb volt; minden **D**-t tartalmazó kombináció szignifikánsan növelte a KP-k latenciáját. Az SS és AUD KP-ra hasonló hatással volt a **CA** kombináció is. A hármas és a négyes adagolásokkor a fő tendencia a latencia növekedése volt, mely a SS és a VIS területeken minden kombinációban szignifikáns volt, míg az AUD területen csak a **DPCA** kezelés hatására jött létre ilyen mértékű változás. Az SS kérgi területen a **DCA**, illetve a VIS régióban a **DPC** kivételével minden hármas kombináció hatása kifejezettebb volt, mint a megfelelő kettős kombinációké.

A farokideg jellemzői közül a relatív refrakter idő mutatta a legkifejezettebb eltéréseket. Akut 1/5 LD₅₀ dózisban a **D**, **C** és **A**, valamint az ezeket tartalmazó kombinációk a refrakter időt szignifikánsan megnyújtották.

Funkcionális neurotoxikus hatások 12 hetes kezelést követően

A szubkrónikus elektrofiziológiai hatások elemzése mellett megtörtént a 12 hetes általános és immuntoxikológiai vizsgálatok is, ugyanazon állatokat és dózisokat felhasználva az említett célokra.

Az idegrendszeri elváltozások kvalitatíve hasonlóak voltak a 24 órás kezelés során észleltekhöz. Az ECoG-n a **D** frekvencia-növekedést váltott ki, ezt a hatást **C**, illetve az **A** fokozta. Önmagában az utóbbi két inszekticid alig gyakorolt hatást a spontán aktivitásra. A KP-ok latenciáját a LOEL dózisu **D** és **A** szignifikánsan megnyújtotta, a **D** hatását a NOEL dózisu **C** vagy **A** erősítette. A farokideg relatív refrakter idejére mindhárom inszekticid hatással volt.

Funkcionális neurotoxikus hatások a pre- és posztnatális egyedfejlődési fázisok során történt kezelést követően

A pre- és posztnatális fejlődési időszakot magába foglaló kezelési protokollban az anyagokat vemhes Wistar nőstényeknek adtuk az alábbi séma szerint:

– *P protokoll* (pregnancy): az anyák a vemhesség 5.-15. napjáig naponta kapták a hatóanyagokat;

– *P+L protokoll* (pregnancy+lactation): kezelés a *P* szerint, majd ezt követően 4 hétig naponta a laktáció időszakában;

– *P+L+P protokoll* (pregnancy+lactation+post-weaning): az anyák a *P+L* protokoll szerint lettek kezelve, majd a hím utódok 8 héten át hetente ötször kapták az anyagokat. Ez utóbbi esetében csak a **DP**, **DC**, **PC** és **DPC** kombinációkat alkalmaztuk.

A *P protokoll* szerint kezelt állatokban a spontán kérgi aktivitás kevésbé változott meg. Csupán a **DC** kombináció okozott theta-sáv erősödést mindhárom kérgi területen, illetve gamma-sáv gyengülést a VIS kérgen. A **DPC** is a gyors sávok csökkenését okozta. A *P+L protokoll* szerint kezelt állatokban a *P protokollban* kapottal részben ellentétes hatások mutatkoztak. A **CP** az aktivitást kissé a lassú hullámok felé toltta el. A **DP** és **DC** azonban mindhárom területen a theta-aktivitás – a a VIS és AUD kérgen szignifikáns – csökkenését okozta. A hármas kombináció a **D**-t tartalmazó kettős kombinációkéhoz hasonló, de kifejezettebb hatást váltott ki. A *P+L+P protokollban* a kettős kombinációk általában a gyors aktivitás felé tolták el az ECoG-spektrumot. **CP** adásakor csökkent az alfa-aktivitás, **DC** esetén pedig a delta sáv az SS, és az alfa sáv a VIS régióban, mindkét utóbbi szignifikánsan. A **DPC** kombináció hatása a kettősökével ellentétes volt, mivel a lassú hullámok felé toltta el az ECoG aktivitását.

A SS KP latenciája a *P protokollban* alig változott. A VIS mezőn mindhárom kettős kombináció, az AUD mezőn pedig a **DP**, szignifikánsan megnövelte a latenciát. A *P+L protokoll* szerint kezelt állatokban a SS KP latenciája szignifikánsan nőtt a **DP** és **CP** kezelés hatására. Az AUD KP is kifejezettebben változott, mint a csak vemhesség alatti kezeléskor, ebben az esetben a **DC** hatása volt szignifikáns. A *P+L+P protokoll* szerint adagolt inszekticid-kombinációk effektusa a *P+L protokollban* kapotthoz hasonló volt; több mért mutató eltérése azonban átlépte át a szignifikancia határát, amely a pre- és posztnatális hatások összegződésére utalt.

A farokideg relatív refrakter ideje a *P protokollban* nem változott szignifikáns mértékben. A *P+L protokollban* a hármas kombináció már szignifikáns megnyúlást idézett elő, jelezvén, hogy az eltérés mértéke a teljes expozíciós idő függvénye. A *P+L+P protokoll* szerint kezelt állatokban a refrakter idő növekedése csak a **PC** csoportban nem volt szignifikáns. Megjegyzendő, hogy az itt szignifikáns hatást mutató kombinációk az akut adagolásban is a refrakter idő számottevő megnyúlását okozták.

A fenti eredményekből levont következtetések az alábbiakban foglalhatók össze:

- Az amitráz esetében kísérleti rendszerünkben igazolható volt a neurotoxikus hatása, melyet eddig az irodalomban kevésbé írtak le.
- A dimetoát és az amitráz hatásai az eltérő hatásmechanizmusuk ellenére hasonlóak, míg a dimetoát és propoxur effektusai a hasonló hatásmechanizmus mellett is eltérőek voltak. A dimetoát és a propoxur nem mutatott szinergizmust.
- A dimetoát és az amitráz hatása a kombinációs kezelések többségében is dominált.
- A spontán kérgi aktivitás változásai több hatóanyag esetében ellentétesek voltak, ha az adagolás csak a prenatális, illetve, ha a pre- és posztnatális időszakban történt.
- A kérgi kiváltott válaszok változásai a $P+L$, illetve $P+L+P$ *protokoll* szerinti kezelés során az indirekt és a direkt expozíció összeadódó hatását jelezték.
- Az inszekticid kezelésre a spontán és a kiváltott agykérgi aktivitás is érzékenyen reagált, de az utóbbi változásai pontosabban értékelhetőek voltak.

Az immuntoxikológiai vizsgálatok eredményei 4 hetes kezelést követően

Az A LOEL és a másik két peszticid NOEL dózisok kombinációnak hatásai:

A testtömeg növekedést mindhárom kombináció mind a vivőanyagok kontrollhoz, mind a LOEL dózisu amitrázhoz (belső kontroll) képest már a 3. héttől szignifikánsan csökkentette.

A vizsgált szervtömegek közül az **A+DC**, illetve az **A+C** kombinációk szignifikánsan növelték a máj 100g testtömegre vonatkoztatott tömegét, amely a kombinációk testtömeg növekedésre gyakorolt hatásával magyarázható. A máj tömegét az agyra vonatkoztatva az **A** LOEL dózis szignifikáns csökkenést okozott, a vizsgált kombinációk ezt a hatást „kivédtek”. A mellékvesék 100g testtömegre vonatkoztatott tömegét az **A** LOEL, valamint annak **C**-nel, illetve **D**-tal való kombinálása szignifikánsan növelte, míg a hármas kombinációban a kontrollhoz képest nem volt értékelhető változás. A mellékvesék agyra vonatkoztatott tömegét csak az **A+C** kombináció fokozta szignifikánsan.

A hematológiai paraméterek közül az **A+D** kombináció szignifikánsan növelte a fehérvérsejt-számot, az MCV érték pedig mind az **A** LOEL dózis, mind a kombinációk esetében szignifikánsan csökkent. Az **A** LOEL dózis és az **A+C** kombináció szignifikánsan csökkentette az immunizált állatok lépsejt-számát. A 10^6 sejtből képződő plakkok száma a hármas és az **A+D** kombinációk esetében csökkent. E hatások következtében az **A** LOEL, az **A+CD**, valamint az **A+D** kombinációkkal kezelt állatokban a lép PFC tartalma szignifikánsan csökkent. A késői túlérzékenységi reakció maximumát az **A+CD** és az **A+C** kombinációk mind a kontrollhoz, mind az **A** LOEL dózishoz képest csökkentették.

A C LOEL és a másik két peszticid NOEL dózisok kombinációinak hatásai:

A **C** LOEL dózissal és a kombinációkkal végzett 4 hetes kezelés nem befolyásolta az állatok testtömeg-növekedését. Az önmagában adott **C** LOEL szignifikánsan csökkentette a popliteális nyirokcsomó relatív tömegét, mely hatást a kombinációban adott anyagok nem befolyásolták.

A hematológiai paraméterek közül a **C** LOEL dózisa 16%-kal ($p>0,05$) növelte a femorális csontvelő sejt-tartalmát, **A** jelenlétében ez a változás 22%-ra nőtt, s a különbség a kontrollhoz képest statisztikailag is szignifikánsnak bizonyult ($p<0,05$). A változás arra

utal, hogy az **A** NOEL dózisa fokozza a **C** LOEL dózisának csontvelősejtekre gyakorolt hatását. A **C** LOEL dózisa szignifikánsan csökkentette a 10^6 lépsejtből képződő plakkok számát, melynek következtében a lép plakk-képző sejtszáma is csökkent. Ezt a hatást az **A** NOEL dózisa kivédte, a többi kombináció gyakorlatilag nem befolyásolta. A késői túlérzékenységi reakciót sem a **C** LOEL dózisa, sem a vizsgált kombinációk nem befolyásolták.

*A **D** LOEL és a másik két peszticid NOEL dózisok kombinációinak hatásai:*

A 4 hetes kezelés során sem a **D** LOEL dózisa, sem a kombinációk nem befolyásolták az állatok testtömeg-növekedését.

A relatív szervtömegek közül a hármas kombináció a kontrollhoz és a **D** LOEL dózisához képest is szignifikánsan növelte a máj, a **D+A** kombináció pedig a herék relatív tömegét. A **D** LOEL dózisa csökkentette a relatív léptömeget ($p < 0,05$), mely hatás a kombinációkban nem jelentkezett.

A vizsgált hematológiai paraméterekben egyik esetben sem találtunk értékelhető változást. A **D** LOEL dózisa, a hármas, valamint a **D+A** kombináció szignifikánsan csökkentette a 10^6 lépsejtből képződő plakkok számát, ennek eredményeként a lép PFC tartalmát. A **D** LOEL dóziséval együtt adott **C** NOEL dózis ezt a hatást kivédte. A késői túlérzékenységi reakció nagyságát és időbeli lefolyását egyik kombináció sem befolyásolta értékelhetően.

A vizsgálatok során megfigyelt toxikus kölcsönhatásokat az alábbi táblázat tartalmazza:

| LOEL dózisú komponens | NOEL dózisú komponens | Paraméter | Változás iránya | Változás jellege* |
|-----------------------|--|--|-----------------|-------------------|
| A | C+D | testtömeg-növekedés | ↓ | B |
| | C | mellékvesék rel. tömege | ↑ | B |
| | D | fehérvérsejt-szám | ↑ | B |
| | C+D C | késői túlérzékenységi reakció maximuma | ↓ | B |
| C | A | femorális csontvelő sejttartalma | ↑ | A |
| D | A+C | máj rel. tömege | ↑ | B |
| | A | herék rel. tömege | ↑ | B |
| | A+C+D | mellékvesék és a poplit. nycs. rel. tömege | ↓ | |
| | A+D | máj rel. tömege | ↑ | |
| | A+D A+C C+D | vörösvértest-szám és MCV | ↓ | |
| | A+D | hematokrit | ↓ | |

*A – a NOEL dózisú komponens fokozza a LOEL dózisban adott peszticid adott paraméterre kifejtett hatását

B – a LOEL dózisú komponens önmagában hatástalan, az adott paraméterben bekövetkező változás a kombinációs partnerrel létrejövő kölcsönhatás eredménye.

Toxikológiai és hematológiai paraméterek a 12 hetes kombinációs kezelést követően

Az A LOEL és a másik két peszticid NOEL dózisok kombinációinak hatásai:

Az állatok testtömeg-növekedését mind a kontrollhoz, mind az A LOEL dózishoz képest mindhárom kombináció szignifikánsan csökkentette.

Az agyra vonatkoztatott szervtömegek közül az A LOEL dózisa csökkentette a tüdő, a vesék és a mellékvesék tömegét; a kombinációk közül az A+D fokozta a vesére és a mellékvesére, az A+C pedig a mellékvesékre kifejtett hatásokat. Mindhárom kombináció kivédte az A popliteális nyirokcsomó tömegét növelő hatását. A vizsgált hematológiai paraméterek közül a fehérvérsejt-szám az A+D és A+C kombinációk hatására a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent

A C LOEL és a másik két peszticid NOEL dózisok kombinációinak hatásai:

A 12 hetes kezelés végére a C+AD és a C+A kombináció mind a kontrollhoz, mind a C LOEL dózishoz képest csökkentette az állatok testtömegét.

A C LOEL dózisa szignifikánsan emelte a thymus, a tüdő, a máj és a mellékvesék agyra vonatkoztatott tömegét, amely hatás egyetlen kombinációban sem érvényesült. A popliteális nyirokcsomó tömegét csak a hármas kombináció növelte szignifikánsan. A hematológiai vizsgálatokban mindhárom kombináció növelte a femorális csontvelő sejttartalmát és csökkentette a hemoglobintartalmat.

A D LOEL és a másik két peszticid NOEL dózisok kombinációinak hatásai:

A D LOEL dóziséval és a kombinációkkal végzett 12 hetes kezelés nem befolyásolta az állatok testtömeg-növekedését. A relatív szervtömegek közül a D+C kombináció hatására a tüdő, a D+A hatására a popliteális nyirokcsomó tömege nőtt meg szignifikánsan ($p < 0,05$ mind a kontrollra, mind a D LOEL dózissal vonatkoztatva). A hematológiai vizsgálatokban a D LOEL dózis csökkentette a vörösvértestek hemoglobintartalmát, ezt a hatást mindhárom kombináció kivédte.

Következtetések

Az emberi toxicitás bármely peszticid esetében elsőrendű szempont, kivéve a célszervezetre nézve abszolút specifikus hatóanyagokat. Az alacsony dózisok hatására az egészségkárosodás, különösen a larvált mérgezésekben, hosszú idő alatt fejlődik ki, és nem vagy alig jár jellegzetes tünetekkel. Ilyen helyzetben különösen fontos a korai felismerés és nyomon követés, melynek jó eszközei az ún. biomarkerek.

A központi idegrendszerre ható xenobiotikumok esetén a hatás-biomarkerek sokkal célszerűbbek az expozíciót jelzőknél, különösen többszörös expozíció fennállásakor. Az alacsony szintű inszekticid-expozíció és a humán neurológiai eltérések kapcsolatának megítélése nem egységes. Ennek ellenére feltételezhető, hogy jelen munka eredményei hozzájárulhatnak az expozíciós határértékek további finomításához, illetve, hogy a kísérletekben észlelt egyes funkcionális eltérések eléggé érzékenyeknek és specifikusnak mutatkoztak ahhoz, hogy a későbbiekben felhasználható biomarkerré váljanak.

Az általános toxikológiai paraméterek közül a peszticid-kölcsönhatások detektálásában a relatív szervtömegek és egyes hematológiai paraméterek érzékenyebbnek bizonyultak, mint a specifikus immunválaszban bekövetkező változások.

Összegezve az általános, neuro- és immuntoxikológiai vizsgálatokban kapott eredményeket, megállapítható volt, hogy az alkalmazott állatkísérletes modellekben nem mutatkozott olyan „univerzális” paraméter, melynek változása minden kölcsönhatás detektálására alkalmas lenne.

Ennek ellenére feltételezhető, hogy a vizsgálatunkban általunk kellően szenzitívnek talált neurofiziológiai paraméterek – biomarkerekként – további experimentális elemzéseket követően alkalmasak lehetnek neurotoxikus peszticid hatóanyagok okozta elváltozások detektálására.