

Növényvédő szerek *in vitro* szemirritációs vizsgálata izolált csirkeszemem

Kormos Éva^{1*}, Buda István², Szabó Rita¹, Lehel József³ és Budai Péter¹

¹Pannon Egyetem Georgikon Kar, 8360 Keszthely, Deák F. u. 16.

²Toxi-Coop Zrt, 2120 Dunakeszi, Pálya u. 2.

³Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Élelmiszer-higiéniai Tanszék, 1078 Budapest, István u. 2.

*e-mail: kormos.eva@georgikon.hu

Összefoglalás

A növényvédő szerek engedélyezéséhez szükséges toxikológiai vizsgálatokban elsősorban emlőszállatokat alkalmaznak. A primer szemirritációs vizsgálatot Draize és munkatársai fejlesztették ki 1944-ben, melyben albinó nyulakat használnak fel. Az évek során több olyan *in vitro* módszert is kidolgoztak, amely nem csak csökkentheti az emlős kísérleti állatok számát, hanem a jövőben ki is válthatja ezek felhasználását. A lehetséges alternatív módszerek közé tartoznak az izolált szerveken végrehajtott szemirritációs tesztek, köztük az izolált csirkeszemet felhasználó vizsgálat is.

Vizsgálatainkban 4 növényvédő szer irritatív hatását tanulmányoztuk az *in vitro* ICE (Isolated Chicken Eye) teszttel. Az *in vitro* irritációs tesztből származó eredményeket összehasonlítottuk a biztonságtechnikai adatlapon közölt irritációs értékekkel. Az *in vitro* eredmények jól korrelálnak a gyártók által közölt *in vivo* adatokkal. Az izolált csirkeszemet felhasználó *in vitro* ICE teszt jelen formájában elővizsgálati módszerként jól alkalmazható a növényvédő szerek engedélyezéséhez szükséges toxikológiai vizsgálatokban, így csökkentve a kísérleti állatfelhasználást.

Kulcsszavak: *in vitro*, izolált csirkeszem; szemirritáció, növényvédő szer

Abstract

The toxicological studies for registration of pesticides are mostly based on mammals. Albino rabbits are used in the generally accepted eye irritation study developed by Draize et al. in 1944. Several various *in vitro* tests have been developed to replace *in vivo* eye irritation testing. One of these alternative methods is the Isolated Chicken Eye test.

In the present study four different pesticides were screened for irritation potential by the Isolated Chicken Eye test. The *in vitro* results were compared with the *in vivo* data from material safety data sheet. In general a good correlation was found between *in vitro* results from ICE test and reported data based on the Draize eye test. The present form of the ICE test can be proposed as a screening method for the registration of pesticides, therefore the number of test animals can be reduced.

Keywords: *in vitro*, isolated chicken eye, eye irritation, pesticide

Bevezetés

A növényvédő szerek engedélyezése során szükséges kockázatbecsléshez az alapot az emlőállatokon végzett toxikológiai kísérletek adják. Az elmúlt években nagy hangsúlyt kaptak és a törekvés azóta is folyamatos az alternatív, *in vitro* módszerek előtérbe helyezésére az 3R szabály (Russell and Burch, 1959) értelmében.

A szemirritáció meghatározására *in vivo* módszerként a Draize és mtsai által (1944) kidolgozott albinó házinyúlön végzett vizsgálat végzendő. A lehetséges alternatív módszerek közé tartoznak az izolált szerveken végrehajtott szemirritációs tesztek, köztük az izolált csirkeszemet felhasználó vizsgálat is. Vizsgálataink során növényvédő szerek primer szemirritációs tulajdonságainak meghatározását végeztük vágóhídról származó csirkeszemen (ICE). A módszert az OECD 438 irányelv szerint végeztük, amely során a szaruhártya duzzadásának, vastagodásának és fluoreszcein megtartásának értékelésével határoztuk meg a növényvédő szerek szemirritációs potenciálját.

Célunk az volt, hogy összehasonlítsuk a vizsgálatba vont növényvédő szerek ICE tesztből származó *in vitro* eredményeit a készítmények biztonságtechnikai adatlapján közölt *in vivo* tesztből származó adataival, abból a célból, hogy alkalmas lehet-e az izolált csirkeszemen végzett vizsgálat jelenlegi formájában a Draize-féle szemirritációs teszt teljes kiváltására a növényvédő szerek engedélyezéséhez szükséges toxikológiai vizsgálatokban.

Anyag és módszer

A vizsgálatainkban felhasznált növényvédő szerek a következők voltak: Dual Gold 960 EC (S-metolaklór), Glyphogan 480 SL (glifozát-izopropilamin-só), Systhane duplo (miklobutanil), Vertimec 1,8 EC (abamektin). A kísérletek során a kezeléseket a készítmények kereskedelmi koncentrációjával végeztük el.

Vizsgálati anyagonként 7 db csirkeszemet kezeltünk: 3 szemre tesztanyag került, 3 szem pozitív kontrollként (triklórecetsav 30 V/V%) és egy szem negatív kontrollként (fiziológiás sóoldat) szolgált.

Az ICE tesztet az OECD 438 irányelv alapján végeztük el.

A vizsgálathoz használt csirkeszemek a vágástól számított két órán belül az izolált körülményeket biztosító szuperfúziós készülékbe kerültek. A készülék a vizsgálat időtartama alatt biztosítja a szükséges hőmérsékletet ($32 \pm 1,5$ °C), továbbá a kamrába elhelyezett csöveken keresztül a szaruhártyák megfelelő nedvesítését (fiziológiás sóoldat). A vizsgáló kamrákba helyezett szemek megfelelőségét a szaruhártyahomály és a 2 V/V%-os fluoreszcein-oldat megtartásának mértékével ellenőriztük. A sérült vagy meg nem felelő szemeket kicseréltük, majd szaruhártya-vastagságot mértünk. A 45-60 perces akklimatizációt követően, de még a kezelés előtt szintén mértük a szaruhártya-vastagságot és meghatároztuk a homályt és a fluoreszcein megtartást mindegyik szemnél. A kezelés közvetlenül a referencia értékek felvétele után történt. A kezelési térfogat 30 μ l, az expozíciós idő pedig 10 másodperc volt minden egyes szem esetében, amelynek lejárta után a tesztanyagot szobahőmérsékletű fiziológiás sóoldat segítségével távolítottuk el a szaruhártya felszínéről (kb. 20 ml/szem). A kezelés előtt felvett referencia értékek a kezelést követő mosás utáni 30., 75., 120., 180., 240., percben végzett megfigyeléseink során rögzített paraméterekkel való összehasonlítást biztosították, amelynek alapján meghatározható volt a vizsgált növényvédő szer szaruhártyára gyakorolt károsító hatása az adott időpontban. A különböző időpontokban (30, 75, 120, 180, 240 perc) mért 3 vizsgálandó paraméterből a kiértékelő táblázat alapján irritációs értékeket képeztünk.

Eredmények

A Dual Gold 960 EC-vel történt kezelés eredményeként, a csirkeszemek szaruhártyája kis mértékben megvastagodott. A szaruhártyahomály kezdetben nem vagy csak kis mértékben jelentkezett, a fluoreszcein megtartás is kismértékű volt. A vizsgálati eredmények alapján a

készítmény enyhén szemirritatívnak bizonyult. A növényvédő szer biztonságtechnikai adatlapján szereplő toxikológiai információk szerint a nyúlón elvégzett *in vivo* vizsgálat alapján a Dual Gold 960 EC mérsékelten szemirritáló tulajdonságú.

A Glyphogan 480 SL növényvédő szerrel kezelt szemeken jelentős szaruhártya vastagodás, nagymértékű homály és jelentős fluoreszcein megtartás jelentkezett. A készítmény a kezelt szemeken szemkorroziót/súlyos szemirritációt okozott a teszt során. A növényvédő szerhez tartozó biztonságtechnikai adatlapon szereplő toxikológiai információk szerint a nyúlón elvégzett *in vivo* vizsgálat alapján a Glyphogan 480 SL súlyos szemkárosodást okoz.

A Systhane duplo alkalmazása során a kezelt csirkeszemeken csak kismértékű szaruhártya-vastagodás volt tapasztalható, majd jelentős szaruhártyahomály és fluoreszcein megtartást mértünk. Az elvégzett vizsgálat alapján a növényvédő szer közepesen szemirritatív. A készítményhez tartozó biztonságtechnikai adatlapon szereplő toxikológiai információk szerint a nyúlón elvégzett *in vivo* vizsgálat alapján a Systhane duplo közepesen irritáló hatású.

A Vertimec 1,8 EC vizsgálati anyaggal elvégzett kezelés eredményeként a csirkeszemeken enyhe szaruhártya-vastagodás és homály, valamint nagymértékű fluoreszcein megtartást jegyeztünk fel. A készítmény a megfigyelt tünetek szerint a közepesen irritatív kategóriába sorolható. A növényvédő szerhez tartozó biztonságtechnikai adatlapon szereplő toxikológiai információk szerint a nyúlón elvégzett *in vivo* vizsgálat alapján a Vertimec 1,8 EC mérsékelten szemirritáló tulajdonságú.

A vizsgálatba vont növényvédő szerek ICE teszttel meghatározott *in vitro* szemirritációs eredményeit és a biztonságtechnikai adatlapjaikon szereplő *in vivo* adatokat az 1. táblázat tartalmazza. A vizsgálat során alkalmazott növényvédő szerek közül a Dual Gold 960 EC, Glyphogan 480 SL, Systhane duplo esetében megegyeztek az *in vitro* ICE tesztből és az irodalmi adatokból származó eredmények. A Vertimec 1,8 EC esetében a biztonságtechnikai adatlapon közölt *in vivo* adathoz képest az *in vitro* teszt során erősebb irritációt értékeltünk.

1. táblázat. A vizsgálati anyagok eredményeinek összehasonlítása

Növényvédő szer	ICE teszt eredménye	Biztonságtechnikai adatlap szerinti besorolás
Dual Gold 960 EC	enyhe szemirritáció	mérsékelten irritatív
Glyphogan 480 SL	szemkorrozió/súlyos szemirritáció	súlyosan irritatív
Systhane duplo	közepes szemirritáció	közepesen irritatív
Vertimec 1,8 EC	közepes szemirritáció	mérsékelten irritatív

Megvitatás

Az általunk növényvédő szerekkel elvégzett ICE tesztből származó *in vitro* eredmények jó korrelációt mutatnak a biztonságtechnikai adatlapon közölt *in vivo* értékekkel. Jelen formájában az *in vitro* ICE teszt azonban még nem használható a Draize-féle szemirritációs vizsgálat teljes kiváltására, mert csak korrozív, súlyosan irritáló eredmény esetén alkalmas a növényvédő szerek primer szemirritációs kategóriákba sorolására. A Glyphogan 480 SL készítmény esetében az ICE teszttel meghatározott erősen irritatív/korrozív eredmény alkalmas a készítmény szemirritációs kategóriába történő besorolására. A Dual Gold 960 EC, Systhane duplo és a Vertimec 1,8 EC készítmények esetében a meghatározott *in vitro* eredmények csak tájékoztató jellegűek az irritációs potenciálra vonatkozóan, kategorizálásra nem alkalmasak. A módszer előnyei között említhető, hogy gyors, olcsó, egyszerű, és megbízható, viszont egyik legfőbb hátránya, hogy nem alkalmas az irritációs hatás eredményeként kifejlődő szaruhártya károsodások reverzibilitásának a megfigyelésére az izolált rendszer korlátozott idejű fenntarthatósága miatt.

Az izolált csirkeszemen végzett *in vitro* módszer ezáltal elsősorban más *in vitro* módszerrel (HET-CAM, Skinethic HCE, stb) együtt alkalmazva lehet a jövőben megfelelő a növényvédő szerek szemirritációs kategóriájának megállapítására.

Hivatkozások

- Draize, J. H., Woodard, G. and Calvery, H. O. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 82. 377–390.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 2009. Test Guideline 438. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.
- Russell, W. M. S. and Burch, R. L. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London.