

IN VITRO HODNOTENIE ÚČINKU HERBICÍDU BENTAZONU NA LEUKOCYTY OVIEC

Pistl J.¹, Kovalkovičová N.², Legáth J.², Holovská V¹., Novotný J.³

Univerzita veterinárskeho lekárstva,¹Ústav mikrobiológie a imunológie, ²Ústav toxikológie,³II. Interná klinika, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, e-mail: pistl@uvm.sk

ABSTRACT

The effect of herbicide bentazone on sheep peripheral blood phagocytes and lymphocytes under *in vitro* conditions was studied by iodo-nitro-tetrazolium reductase and leukocyte migration-inhibition test. Herbicide, dissolved in dimethylsulphoxide, was tested at the concentrations of $1 \cdot 10^{-1}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l. After exposure, the significant decrease in metabolic activity of phagocytic cells was not registered, significant cytotoxic effect (decrease of spontaneous leukocyte migration) was observed at the concentration of $1 \cdot 10^{-1}$ mol/l and immunotoxic effect (decrease of lymphocyte activation by phytohaemagglutinine) at the concentrations of $1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

ÚVOD

Pre účely stanovenia imunosupresívneho alebo imunostimulačného účinku xenobiotík bolo vyvinutých niekoľko metód na základe sledovania závislosti odpovede na dávke, toxikokinetiky, stanovenia priamych a nepriamych účinkov na imunitný systém ako aj biologickej relevancie *in vitro* testov ku účinkom agensov *in vivo* (Kačmár a kol., 1999). Dlhodobé štúdiá u zvierat stanovujúce toxikologické riziko týchto zlúčenín sú časovo a finančne náročné, dôležitú úlohu zohráva aj etické hľadisko. V súčasnosti sa uplatňujú snahy znížiť počet a minimalizovať utrpenie experimentálnych zvierat, čo si vyžaduje použitie reprodukovateľných a spoľahlivých *in vitro* testovacích systémov vhodných na rýchly skrining imunotoxického potenciálu pesticídnych látok.

Cieľom tohto *in vitro* štúdia bolo stanoviť účinok herbicídu bentazonu na funkciu fagocytov a lymfocytov izolovaných z periférnej krvi oviec.

MATERIÁL A METÓDY

Pokusné zvieratá: 5 klinicky zdravých jednoročných oviec plemena Merino.

Testovaný herbicíd: Bentazon, C₁₀H₁₂N₂O₃S, m.h. 240,3, CAS reg. č. 25057-89-0, Sigma-Aldrich, USA; 99,9 %, perorálna toxicita (LD₅₀): potkan >1000, pes > 500, králik 750, mačka 500 mg.kg⁻¹ ž. hm. (The Pesticide Manual, 1994).

Rozpúšťadlo: dimetylsulfoxid (DMSO), ktorého konečná koncentrácia v kultivačnom médiu bola 1 %.

Základné molárne koncentrácie herbicídu: $1 \cdot 10^{-1}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹, pridané ku suspenziám leukocytov v objemovom pomere 1:100 (výsledná koncentrácia pesticídu bola 1 %).

Izolácia leukocytov z periférnej krvi oviec: metódou osmotického šoku erytrocytov podľa Karlsona a Kaneka (1973).

Imunologické funkčné testy:

a) Iodo-nitro-tetrazolium reductázový test (INT): kvantitatívne hodnotenie tetrazolium - reductázovej aktivity fagocytov bolo vykonané podľa metódy Lokaja a Oburkovej (1975) pre hodnotenie metabolickej aktivity fagocytov počas záťaže.

b) Leukocytový migračno-inhibičný test (LMIA): bol použitý za účelom stanovenia reaktívnej kapacity lymfocytov po mitogénnej aktivácii a vychádzal z metódy Bendixena a kol. (1976).

Štatistické hodnotenie výsledkov: Studentov t-test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Fagocytujúce bunky vykazovali väčšiu rezistenciu k bentazonu ako lymfocyty. Index metabolickej aktivity fagocytov nebol expozíciou ovplyvnený (Tab.1.), bentazon však prejavil signifikantný cytotoxický účinok pri koncentrácii 1.10^{-1} mol.l⁻¹ ($p < 0,01$) a imunotoxický účinok pri koncentráciách 1.10^{-2} – 1.10^{-3} mol.l⁻¹ ($p < 0,001$) a 1.10^{-4} mol.l⁻¹ ($p < 0,05$; Tab. 2). Výsledky korelujú s *in vivo* sledovaniami autorov Mikula a kol. (1992).

Tab. 1. Priemerné hodnoty (\pm SD) indexov metabolickej aktivity fagocytov periférnej krvi oviec v prítomnosti rôznych koncentrácií bentazonu

$(\pm$ SD – štandardná odchýlka; DMSO – kontrola s rozpúšťadlom)								
Koncentrácia Pesticíd	Kontrola	DMSO	1.10^{-1} mol.l ⁻¹	1.10^{-2} mol.l ⁻¹	1.10^{-3} mol.l ⁻¹	1.10^{-4} mol.l ⁻¹	1.10^{-5} mol.l ⁻¹	1.10^{-6} mol.l ⁻¹
Bentazon	2,76 \pm 1,08	2,58 \pm 0,94	2,01 \pm 0,61	1,99 \pm 0,38	2,02 \pm 0,15	2,31 \pm 0,69	2,35 \pm 0,27	2,29 \pm 0,31

Tab. 2. Stanovenie cytotoxického účinku na základe spontánnej migrácie a imunotoxického účinku vo vzťahu ku indexom migrácie leukocytov oviec exponovaných bentazonom v LMIA

(*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ^a – zväčšenie 17,5 x; MI – index migrácie leukocytov; CT – cytotoxický účinok; IT – imunotoxický účinok; SD – štandardná odchýlka; DMSO – kontrola s rozpúšťadlom; LMIA – leukocytový migračno-inhibičný test)

Pesticíd	Koncentrácia (mol.l ⁻¹)	Plocha spontánnej migrácie leukocytov (cm ²) ^a \pm SD	MI \pm SD	Účinok
Kontrola	—	27,56 \pm 8,90	0,44 \pm 0,17	
DMSO	—	26,61 \pm 9,94	0,47 \pm 0,14	
Bentazon	1.10^{-1}	13,67 \pm 2,07**	—	CT
	1.10^{-2}	24,00 \pm 5,48	0,71 \pm 0,24***	IT
	1.10^{-3}	27,00 \pm 1,55	0,76 \pm 0,11***	IT
	1.10^{-4}	25,67 \pm 1,37	0,59 \pm 0,10*	IT
	1.10^{-5}	28,50 \pm 0,58	0,43 \pm 0,11	—
	1.10^{-6}	25,67 \pm 2,58	0,46 \pm 0,04	—

Pod'akovanie: Práca vznikla s podporou grantu VEGA 1/8115/01 a Národného referenčného laboratória pre pesticidy Univerzity veterinárskeho lekárstva v Košiciach.

LITERATÚRA

- Bendixen, G., Bentzen, K., Clausen, J. E., et al. (1976): Inhibition of human leucocyte migration. In Natvig, J. B., Permann, P., Wigzel, H. eds. Lymphocytes. Isolation, Fractionation and Characterization. Scand. I. Immunol., Suppl. 5, Universitetsforlaget, Nyegaard, Oslo, pp. 244 – 267.
- Kačmár, P., Pistl, J., Mikula, I. (1999) Immunotoxicology and veterinary medicine. Acta veterinaria 68, 57 – 79.
- Karlson, G. P. and Kaneko, J. P. (1973) Isolation of leucocytes from bovine peripheral blood. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 853 – 856.
- Lokaj, V. and Oburkova, P. (1975) Determination of tetrazolium-reductase activity of leukocytes (In Czech). Imunol. Zprav. 6, 42 – 44.
- Mikula, I., Pistl, J., Kačmár, P. (1992) Immune response of organism at subchronic intoxication with herbicide Bentazon TP. Vet. Hum. Toxicol. 34, 507 – 509.
- The Pesticide Manual (1994) Cambridge, 1994, pp. 1341.