

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**BUDAI PÉTER**

**VESZPRÉMI EGYETEM  
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁG-TUDOMÁNYI KAR  
KESZTHELY**

**2002**



VESZPRÉMI EGYETEM  
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁG-TUDOMÁNYI KAR  
Állattudományi Intézet, Állattani és Toxikológiai Tanszék

MULTIDISZCIPLINÁRIS AGRÁRTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Vezető:  
DR. habil. VÁRNAGY LÁSZLÓ  
az MTA doktora

Tudományág: Állatorvostudományok

Vezető:  
DR. habil. VÁRNAGY LÁSZLÓ  
az MTA doktora

Témavezető:  
DR. habil. VÁRNAGY LÁSZLÓ  
az MTA doktora

**MEZŐGAZDASÁGI VEGYI ANYAGOK IRRITATÍV  
POTENCIÁLJÁNAK VIZSGÁLATA *IN VITRO* HET-CAM  
TESZTTTEL**

Készítette:  
**BUDAI PÉTER**

KESZTHELY

2002

**MEZŐGAZDASÁGI VEGYI ANYAGOK IRRITATÍV  
POTENCIÁLJÁNAK VIZSGÁLATA *IN VITRO* HET-CAM  
TESZTTTEL**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:  
BUDAI PÉTER

Készült a Veszprémi Egyetem  
Multidiszciplináris Agrártudományok Doktori Iskolája keretében.

Témavezető: Dr. Várnagy László DSc.

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(Dr. Várnagy László)

A jelölt a doktori szigorlaton 100% -ot ért el,

Keszthely,

.....  
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: Dr. Lehel József Ph.D.

igen /nem

.....  
(Dr. Lehel József)

Bíráló neve: Dr. Kiss István C.Sc.

igen /nem

.....  
(Dr. Kiss István)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján.....% - ot ért el

Keszthely,

.....  
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....  
Az EDT elnöke

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. KIVONATOK.....</b>                                | <b>5</b>  |
| <b>1.1. Magyar nyelvű kivonat.....</b>                  | <b>5</b>  |
| <b>1.2. Angol nyelvű kivonat.....</b>                   | <b>7</b>  |
| <b>1.3. Német nyelvű kivonat.....</b>                   | <b>7</b>  |
| <b>2. BEVEZETÉS.....</b>                                | <b>8</b>  |
| <b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>                      | <b>14</b> |
| <b>3.1. Alternatív módszerek.....</b>                   | <b>14</b> |
| <b>3.2. A chorioallantois membrán felhasználása</b>     |           |
| <b>    a szemirritáció vizsgálatában .....</b>          | <b>23</b> |
| 3.2.1. A tojások előkészítése.....                      | 24        |
| 3.2.1.1. A légkamrán keresztüli behatolás.....          | 24        |
| 3.2.1.2. Behatolás a tojás egyenlítőjén át.....         | 25        |
| <b>3.3. A kísérleti körülmények között vizsgált</b>     |           |
| <b>    vegyi anyagok hatása a tyúktojás</b>             |           |
| <b>    chorioallantois membránjára .....</b>            | <b>28</b> |
| <b>3.4. A házityúk embrionális fejlődése.....</b>       | <b>37</b> |
| 3.4.1. Az embrionális membránok.....                    | 41        |
| 3.4.2. A chorioallantois membrán szerkezete.....        | 43        |
| <b>3.5. A szem fölépítése.....</b>                      | <b>45</b> |
| <b>4. KÍSÉRLETI RÉSZ.....</b>                           | <b>48</b> |
| <b>4.1. Vizsgálati anyagok.....</b>                     | <b>48</b> |
| 4.1.1. A vizsgálatokban alkalmazott koncentrációk ..... | 48        |
| 4.1.2. Herbicidek.....                                  | 49        |
| 4.1.3. Inszekticidek.....                               | 58        |

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.4. Fungicidek, baktericidek.....                             | 60        |
| 4.1.5. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok.....          | 64        |
| 4.1.6. Folyékony műtrágyák .....                                 | 66        |
| <b>4.2. Kísérleti állatok .....</b>                              | <b>67</b> |
| 4.2.1. A Shaver Starcross tojóhibrid.....                        | 67        |
| 4.2.2. Az új-zélandi fehér nyúl .....                            | 68        |
| <b>4.3. Vizsgálati módszerek.....</b>                            | <b>69</b> |
| 4.3.1. A HET-CAM teszt.....                                      | 69        |
| 4.3.1.1. Felszerelések, eszközök, labor vegyszerek.....          | 69        |
| 4.3.1.2. A vizsgálat kivitelezése .....                          | 70        |
| 4.3.1.3. A tojások feldolgozása.....                             | 71        |
| 4.3.1.3.1 Makroszkópos vizsgálatok.....                          | 71        |
| 4.3.1.3.2. Szöveti vizsgálatok .....                             | 72        |
| 4.3.1.3.2.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok.....                   | 72        |
| 4.3.1.3.2.2. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok.... | 73        |
| 4.3.2. Draize-féle szemirritációs vizsgálat nyúlon.....          | 73        |
| 4.3.2.1. Felszerelések, eszközök.....                            | 73        |
| 4.3.2.2. A vizsgálat kivitelezése .....                          | 74        |
| 4.3.2.3. A nyúlszem feldolgozása.....                            | 74        |
| 4.3.2.3.1. Makroszkópos vizsgálatok.....                         | 74        |
| <b>4.4. Statisztikai vizsgálatok .....</b>                       | <b>76</b> |
| <b>5. EREDMÉNYEK, ÉRTÉKEKELÉS.....</b>                           | <b>78</b> |
| <b>5.1. A HET-CAM tesztből származó eredmények .....</b>         | <b>78</b> |
| 5.1.1. Makroszkópos eredmények .....                             | 78        |
| 5.1.1.1. Herbicidek makroszkópos eredményei.....                 | 78        |
| 5.1.1.2. Inszekticidek makroszkópos eredményei .....             | 83        |

|                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.1.1.3. Fungicidek, baktericidek makroszkópos eredményei.....                                     | 84         |
| 5.1.1.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok<br>makroszkópos eredményei.....               | 85         |
| 5.1.1.5. Folyékony műtrágyák makroszkópos eredményei .....                                         | 86         |
| 5.1.2. A makroszkópos eredmények értékelése.....                                                   | 87         |
| 5.1.2.1. Herbicidek makroszkópos eredményeinek értékelése .....                                    | 88         |
| 5.1.2.2. Inszekticidek makroszkópos eredményeinek értékelése ..                                    | 90         |
| 5.1.2.3. Fungicidek, baktericidek makroszkópos<br>eredményeinek értékelése .....                   | 91         |
| 5.1.2.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok<br>makroszkópos eredményeinek értékelése..... | 93         |
| 5.1.2.5. Folyékony műtrágyák makroszkópos<br>eredményeinek értékelése .....                        | 94         |
| 5.1.3. Mikroszkópos eredmények.....                                                                | 95         |
| 5.1.3.1. A fénymikroszkópos vizsgálatok eredményei .....                                           | 95         |
| 5.1.3.2. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei .....                                      | 97         |
| <b>5.2. A Draize-féle tesztből származó eredmények.....</b>                                        | <b>100</b> |
| 5.2.1. Makroszkópos eredmények .....                                                               | 100        |
| 5.2.1.1. Herbicidek makroszkópos eredményei.....                                                   | 100        |
| 5.2.1.2. Inszekticidek makroszkópos eredményei .....                                               | 104        |
| 5.2.1.3. Fungicidek, baktericidek makroszkópos eredményei.....                                     | 104        |
| 5.2.1.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok<br>makroszkópos eredményei.....               | 106        |
| 5.2.1.5. Folyékony műtrágyák makroszkópos eredményei .....                                         | 106        |
| 5.2.2. A makroszkópos eredmények értékelése.....                                                   | 107        |
| 5.2.2.1. Herbicidek makroszkópos eredményeinek értékelése ....                                     | 108        |

|                                                               |            |
|---------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.2.2. Inszekticidek makroszkópos                           |            |
| eredményeinek értékelése .....                                | 110        |
| 5.2.2.3. Fungicidek, baktericidek makroszkópos                |            |
| eredményeinek értékelése .....                                | 111        |
| 5.2.2.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok          |            |
| makroszkópos eredményeinek értékelése .....                   | 112        |
| 5.2.2.5. Folyékony műtrágyák makroszkópos                     |            |
| eredményeinek értékelése .....                                | 112        |
| <b>6. MEGBESZÉLÉS .....</b>                                   | <b>114</b> |
| <b>6.1. A HET-CAM teszt és a Draize-féle teszt</b>            |            |
| <b>eredményeinek összehasonlítása .....</b>                   | <b>114</b> |
| 6.1.1. A herbicidek eredményeinek összehasonlítása.....       | 114        |
| 6.1.2. Az inszekticidek eredményeinek összehasonlítása.....   | 117        |
| 6.1.3. Fungicidek, baktericidek                               |            |
| eredményeinek összehasonlítása .....                          | 118        |
| 6.1.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok            |            |
| eredményeinek összehasonlítása .....                          | 121        |
| 6.1.5. Folyékony műtrágyák eredményeinek összehasonlítása ... | 122        |
| <b>6.2. A HET-CAM teszt és a Draize-féle teszt</b>            |            |
| <b>eredményeinek statisztikai vizsgálata.....</b>             | <b>123</b> |
| <b>6.3. A mikroszkópos eredmények értékelése .....</b>        | <b>123</b> |
| <b>6.4. Következtetések és javaslatok.....</b>                | <b>124</b> |
| <b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>                                 | <b>128</b> |
| <b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>                            | <b>135</b> |
| <b>9. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>                               | <b>136</b> |
| <b>10. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>                      | <b>147</b> |

## 1. KIVONATOK

### 1.1. Magyar nyelvű kivonat

A szerző a kísérletei során mezőgazdasági vegyi anyagok irritációs potenciálját vizsgálta az *in vitro* HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) teszttel. A nemzetközi szakirodalmak alapján ezen vizsgálati módszert ez idáig agrokemikáliák irritatív potenciáljának meghatározására nem használták fel, így az általa elvégzett vizsgálatok a vegyi anyag típusát illetően újak nevezhetők.

A kísérleti módszerként alkalmazott *in vitro* HET-CAM teszt esetében a CAM-on a kezelés hatására jelentkezett károsodásokat a klasszikus makroszkópos kiértékelés mellett, fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos technikák segítségével is vizsgálta.

Összehasonlító szándékkal elvégezte az *in vivo* Draize-féle szemirritációs tesztet. Az *in vivo* és az *in vitro* teszt eredményeinek összehasonlításával próbált választ adni arra, hogy az *in vitro* HET-CAM teszt jelen formájában alkalmas-e az agrokemikáliák irritatív potenciáljának meghatározására és, hogy alkalmas lehet-e az *in vivo* Draize-féle szemirritációs teszt felváltására.

Az *in vitro* HET-CAM tesztet az Invitox Protocol 47. száma alapján végezte el. A tyúktojásokat 10 napig keltette, majd a méshéj és a héjmembrán eltávolítása után a vizsgálati anyagokat közvetlenül a chorioallantois membránra jutatta rá. A kezelést követően 300 másodpercig figyelte meg a membránt és a vérrendszerben bekövetkezett károsodásokat. Az elváltozások kiértékelését számítógépes

program segítségével végezte el, a kapott irritációs indexeket beillesztve egy kiértékelő táblázatba, irritációs potenciálokat határozott meg.

Az *in vivo* Draize-féle szemirritációs vizsgálat elvégzése során a nyúl szem kötőhártyaszákjába helyezte a vizsgálati anyagokat. A szemben jelentkező elváltozásokat a kezelést követő 1. óra, 24. óra, 2., 3., 4., 7. nap után értékelte. A vizsgálati eredmények értékelését a Draize-féle szemirritációs módszer pontozási rendszere és kiértékelő táblázata alapján végezte.

A szerző vizsgálataiban során alkalmazott mezőgazdasági vegyi anyagok *in vitro* HET-CAM tesztből származó eredményei jó korrelációt ( $r = 0,78449$ ) mutattak az *in vivo* adatokkal.

A fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével a szerző megállapította, hogy a mezőgazdasági vegyi anyagokkal elvégzett kezelés hatására a CAM mesenchyma állományában lévő erek falának hálózati rostja károsodnak, aminek eredményeként vérzések alakultak ki a kémiai irritáció hatására.

A kísérletbe vont mezőgazdasági vegyi anyagok *in vivo* és *in vitro* eredményeinek összehasonlításából, és a nemzetközi szakirodalomban található hasonló jellegű eredményekből a szerző megállapította, hogy a HET-CAM teszt nem alkalmas az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs vizsgálat teljes egészében történő kiváltására.

A HET-CAM teszt jelen formájában, mint szemirritációs elővizsgálati módszer javasolható.

Az *in vitro* HET-CAM teszt fontos eleme lehet azon *in vitro* tesztrendszernek, amely a jövőben képes lesz az *in vivo* Draize-féle szemirritációs vizsgálat kiváltására.

## 1.2. Angol nyelvű kivonat

The Draize rabbit eye irritation test receives particular criticism because of the injuries inflicted on the test animals. One of the most studied alternative methods is the Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM).

A comparative screening was performed with a set of agrochemicals to establish parallel data on *in vitro* (HET-CAM) and *in vivo* (Draize) results.

Although the actual form of the HET-CAM test is a valuable prescreen method for predicting the ocular irritation of chemicals, in the toxicological tests for registration of agrochemicals the *in vivo* Draize test cannot be replaced by the *in vitro* HET-CAM test.

## 1.2. Német nyelvű kivonat

Das Draize Hase Augen irritation Test wurde oft kritisiert weil die Versuchs Tieren erleben oft schmerzen wehrend des Experiment. Die meist studierte alternative methode ist das Hühner Ei Test – Chorioallanoic Membrane (HET-CAM).

Die Verleichs untersuchungen wurden erledigt mit eine reihen von veischenen Agrochemikalien, wegen die parallel ergebnisse *in vitro* (HET-CAM) und *in vivo* (Draize) untersuchungen.

In jetzige form von das HET-CAM Test ist eine vertvolle voruntersuchungs methode in vorzeichnen von augen irritation. In toxikologishe Test für registration von Agrochemikalien, kann das *in vitro* HET-CAM Test nicht erzetzen das *in vivo* Draize Test

## 2. BEVEZETÉS

A Világbank előrejelzése szerint a Föld lakosainak száma 2030-ig 50%-kal nő, és eléri a 8,5 milliárdot. Az egy főre jutó mezőgazdasági terület, amely harminc évvel ezelőtt még fél hektár volt, harminc év múlva várhatóan egyötöd hektárra csökken. Ez a népességrobbanás világméretű élelmezési problémát vet fel, amelynek jórészt a mezőgazdaságnak kell megoldania, az elosztási, kereskedelmi stb. viszonyok megváltoztatása mellett (Gáborjányi és mtsai, 1995).

A Föld 88,4 millió négyzetkilométeres szárazföldjének legfeljebb 30 %-a alkalmas szántóföldi művelésre. Az ipar éppen ezekből a földekből foglal el újabb és újabb területeket, itt épülnek új települések, utak és üdülőhelyek. A Föld népességének nagyarányú gyarapodása és a mezőgazdaságilag művelhető területek csökkenése folytán keletkező feszültség, csak a mezőgazdasági termékek minőségének javításával és azok mennyiségének fokozásával oldható meg.

A mezőgazdasági területeken termesztett növényeinkben rejlő genetikailag determinált termőképesség csak magas szintű növénytermesztési technológiák alkalmazásával közelíthető meg. A fenntartható mezőgazdaság kívánalmainak eleget tevő növénytermelés az integrált növényvédelmen alapul. Az integrált növényvédelem szisztematikus megvalósítása a kémiai növényvédelmi módszerek csökkenését eredményezi, bár azok továbbra is meghatározóak lesznek. A termesztett növényeink táplálékforrásai különböző baktérium, gomba, és rovar szervezeteknek. Megbízható felmérések szerint a

kultúrnövényeket károsító élő szervezetek napjainkban világszerte, átlagosan mintegy 35%-kal csökkentik a mezőgazdasági terméshozamokat. Ebből az állati kártevők, elsősorban a rovarok 14%, a mikroorganizmusok, ezek között is főleg a gombák 12% és a gyomnövények 9% termésvesztést okoznak.

A növényvédelem feladata, hogy kiküszöbölje ezt a káros hatást, biztonságossá tegye a termelést (Gáborjányi és mtsai, 1995).

Az ember számára konkurens szervezetek elleni küzdelemben a fizikai és a biológiai növényvédelmi eljárások mellett legfontosabb szerepe jelenleg a növényvédő szerek növényvédelmi célból történő felhasználásának van.

A mezőgazdasági vegyi anyagok a felhasználás során nem csak a célszervezetekre fejthetik ki biológiai aktivitásukat, hanem közvetlen vagy közvetve kapcsolatba kerülhetnek más élő szervezettel és azok egészségét is károsíthatják. Káros lehet az emberi szervezetre, a magasabb rendű állatokra, valamint az élő és élettelen környezetre is.

A kijuttatást végző ember testfelszínére jutva a mezőgazdasági vegyi anyagok egyrészt helyi mérgezést, másrészt az érintkezés helyéről felszívódva általános mérgezést válthatnak ki. A helyi mérgezés során a vegyi anyagok irritatív tulajdonságaiktól függően különböző mértékű szem- és bőrkárosodással kell számolnunk. A szembe jutott mérgező anyagok az enyhe, reverzibilis kötő- és szaruhártya gyulladástól kezdve súlyos és maradandó szemkárosodást, szaruhártyahomályt, sőt megvakulást és egyéb életveszélyes károsodást okozhatnak (Bordás, 1971).

A mezőgazdasági vegyi anyagok, elsősorban a növényvédő szerek, mint veszélyes vegyi anyagok forgalomba hozatala és felhasználása világszerte, így hazánkban is engedélyköteles. A mezőgazdasági tárca által vezetett és koordinált engedélyeztetési folyamat fontos részét képezik a biztonsági vizsgálatok közé tartozó állatkísérleti toxikológiai vizsgálatok. Ezen vizsgálatok eredményeinek segítségével megismerhetők a mezőgazdasági vegyi anyagok egészségkárosító hatásai magasabb rendű szervezetekben. Az állatkísérleti adatok ismeretében lehetőség van a felhasználás körülményeinek oly módon történő meghatározására, amely a lehető legmagasabb szinten biztosítja az emberi egészség megóvását.

A mezőgazdasági vegyi anyagok engedélyeztetéséhez szükséges állatkísérleti toxikológiai vizsgálatok közé tartozik az *in vivo* primer szemirritációs teszt, amely alkalmas arra, hogy a nyúl szemébe közvetlenül bejuttatott mezőgazdasági vegyi anyag szemkárosító hatását felmérjük, és az esetleges emberi expozíció esetén a veszélyt előre jelezzük. A kísérleti állat a mérgezés hatására fájdalmat érez mindaddig, amíg a szervezete számára az idegen anyag jelen van és károsít. Emlős kísérleti állatok szenvedése árán juthatunk olyan megbízható adatokhoz, amelyekkel az esetleges emberi mérgezés legjobban jellemezhető.

„Az értékrend kérdése akkor is felvetődik, ha egy állat halálára tudományos szempontból van szükség, például az állatkísérleteknél. Ezen a ponton abszolút kételkedő vagyok. Ha valakinek meghal a gyermeke az sokkal borzasztóbb, mintha a ketrecben tartott majma halna meg. Bűnnek tartom, ha egyértelmű és általános propagandát folytatnak az állatkísérletek ellen. Hány rhesusmajom élete ér fel egy gyermek

életével? Természetesen ellenzem, hogy bármelyik gyerek körömlakkot cseppentsen egy nyuszi szemébe, csak hogy lássa, mi történik! Ebben az esetben sokkal könnyebb eldönteni mi a helyes, mint a fontos és szükséges állatkísérletek esetében. Azt kell szem előtt tartani, hogy az állat sok tekintetben nemhogy kevésbé, hanem sokkal jobban szenved, mint az ember." (Lorenz, 1991).

Az *in vivo* emlős kísérleti állatokat használó vizsgálati módszerek mellett léteznek olyan kísérleti metodikák, amelyek segítségével csökkenthető a felhasznált kísérleti állatok száma, amelyek finomítva a kísérleti körülményeket mérséklék a kísérleti állatok szenvedéseit, és amelyek alkalmasak az emlősállatokon végzett vizsgálatok kiváltására. Ezekhez a vizsgálati módszerekhez, amelyeket alternatív módszereknek neveznek, tartoznak az *in vitro* technikák, amelyek szövettenyésztet használva váltják ki a magasabb rendű kísérleti állatok felhasználását a toxikológiai vizsgálatokban.

Az experimentális toxikológia valamennyi szakterületén megjelentek a különböző *in vitro*, alternatív módszerek, de általánosan elmondható, hogy jelenleg még egyetlen *in vitro* módszert sem hagytak jóvá teljes egészében.

A primer szemirritáció területén az OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 1987-ben beleegyezett abba, hogy a jól érvényesített *in vitro* tesztekkel származó adatokat elfogadják az *in vivo* adatok helyett. A perspektivikus alternatív módszerek jelenleg az engedélyeztetés és az érvényesítés folyamatában vannak, ezek közé tartoznak a tyúktojás chorioallantois membránját (CAM) használó *in vitro* vizsgálati módszerek is (Walum és mtsai, 1992).

Kísérleteim során mezőgazdasági vegyi anyagok irritációs potenciálját vizsgáltam az *in vitro* HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) teszttel. A nemzetközi szakirodalmak alapján a tyúktojás chorioallantois membránját használó vizsgálati módszereket ez idáig kozmetikumok, ipari és háztartási vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározására használták fel, agrokemikáliák tesztelésére nem, így az általam elvégzett vizsgálatok a vegyi anyag típusát illetően újnak nevezhetők.

Vizsgálataim során célul tűztem ki a különböző mezőgazdasági vegyi anyagok, növényvédő szerek, műtrágyák, növényvédő szer komponensek *in vitro* vizsgálattal történő irritációs potenciáljának meghatározását. A vizsgálati anyagként alkalmazott készítmények kiválasztásánál figyelembe vettem az irodalmi irritációs adatokat, és a nem irritatív vegyületektől az erősen irritatív vegyületekig az irritációs skálának megfelelően vontam be a mezőgazdasági vegyi anyagokat a kísérletekbe.

A kísérleti módszerként alkalmazott *in vitro* HET-CAM teszt esetében a chorioallantois vérrendszerének vegyi anyag hatására bekövetkezett károsodásait a klasszikus makroszkópos kiértékelés mellett, fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos technikák segítségével is vizsgáltam annak érdekében, hogy a kísérleti metodikát finomítva részletesebben tanulmányozhassam a chorioallantois vérereinek károsodását.

A mikroszkópos vizsgálatok elvégzésénél reprezentatív jelleggel egy-egy herbicid, fungicid és növényvédő szer segédanyag hatását vizsgáltam részletesen a CAM szöveti struktúrájában.

Összehasonlító szándékkal a kísérletbe vont vizsgálati anyagokkal elvégeztem az *in vivo* primer Draize-féle szemirritációs tesztet, és az *in vitro* tesztekéből származó adatokat összevettem az *in vivo* vizsgálatokból származó eredményekkel. Az összehasonlítás eredményeiből próbáltam választ adni arra a kérdésre, hogy az *in vitro* HET-CAM teszt jelen formájában alkalmas lehet-e arra, hogy a jövőben felváltsa a már évtizedek óta szinte kizárólagosan használt Draize-féle *in vivo* primer szemirritációs tesztet a vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározásában.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. Alternatív módszerek

A mezőgazdasági vegyi anyagok engedélyezési eljárásához pontosan meghatározott körülmények között végzett toxikológiai állatkísérletekre van szükség. Emlős kísérleti állatokon végzett kutatómunka az alapja a mezőgazdasági vegyi anyagok humán toxicitás meghatározásának. A ma még szinte kizárólagosan használt emlős állatkísérletek mellett, már viszonylag régebb óta megjelentek az alternatív módszerek. Az alternatív módszerek fogalmi kategóriájának meghatározásához vissza kell kanyarodnunk a Russel és Burch által megalkotott 3R szabályhoz, amely az angol helyettesítés (Replacement), finomítás (Refinement) és létszámcsökkentés (Reduction) szavak kezdőbetűiből áll (Russel és Burch, 1959).

Ezen meghatározásból kiindulva minden olyan kísérleti módszer és eljárás, amely képes az állatkísérleteket helyettesíteni vagy a kísérletben felhasznált állatok számát csökkenteni, illetve a kísérleti körülményeket finomítva a kísérleti állatok szenvedéseit mérsékelni, az alternatív módszerek közé tartozik (Nab és mtsai, 1993).

Az alternatív módszerek ezen fogalmi meghatározásának széleskörű elfogadása viszonylag új keletű, már számos olyan módszer létezik, amely csökkenti a kísérleti állatok felhasználását pl. az alacsonyabb rendű szervezetek vagy az *in vitro* technikák felhasználása

elővizsgálati módszerként, illetve finomítva a kísérleti körülményeket csökkenti a kísérleti állatok szenvedéseit pl. a klasszikus LD<sub>50</sub> meghatározására irányuló akut toxikológiai vizsgálatokat felváltó akut alternatív módszerek.

Az alternatív módszerek kifejlesztésének törekvése főleg etikai okokra vezethető vissza, de más tényezők is szerepet játszanak. A laborállatok használata költséges, az állatkísérletek elvégzése hosszú ideig tart és gyakran nehéz szabványosítani őket. Azon alternatív módszerek, amelyek képesek helyettesíteni a kísérleti állatokat, rendszerint kevésbé összetettek és a kísérleti feltételeket könnyebb szabványosítani. Az alternatív módszerek egyszerűsége lehet előny, különösen ha a szerv/szövet/sejt szinten lejátszódó mechanizmus vizsgálata a cél, de lehet hátrány is, hiszen az egyszerűsített rendszerek válasza eltérhet a szervezet egészének választaitól (Nab és mtsai, 1993).

Az alternatív módszerek hatása a kísérleti állatfelhasználásra korlátozott az alapkutatásokon belül, ami a kísérleti eljárások egyedi természetéből adódik. Az emlős kísérleti állatfelhasználás szempontjából nagyságrendileg nagyobb volument képviselő alkalmazott kutatás, mint a biztonsági vizsgálatok, a szabvány műveleti eljárások és a szabályozó irányelvek szigorú érvényesítését igénylik. Az alternatív módszerek e területeken való bevezetése megköveteli a nemzeti engedélyező hatóságok és a nemzetközi szervezetek (pl. OECD) jóváhagyását. Ahhoz, hogy az alternatív módszereket jóváhagyják és gyakorlati bevezetésre kerüljenek a biztonsági vizsgálatokban, széleskörű összehasonlító, érvényesítő vizsgálatokra van szükség. Ez okból kifolyólag az alternatív módszerek bevezetése az alkalmazott kutatásban nagyon nehézkes és

hosszú ideig tart, de a hatása nagyon fontos lehet, különösen akkor, ha a különböző országok szabályozásai és irányelvei egységesek. Sajnos, ez ritkán van így, és a vegyi anyagok vizsgálatait gyakran még mindig a különböző nemzeti előírások alapján végzik. Példaként említhető az akut LD<sub>50</sub> vizsgálatokat felváltó alternatív módszerek helyzete. Ezen alternatív akut vizsgálati módszerek bekerültek az OECD Guideline-ok közé, de elterjedésüket nagyban nehezíti az a tény, hogy ez idáig csak Nagy-Britanniában hoztak olyan jogszabályt, amely betiltja a klasszikus akut LD<sub>50</sub> toxikológiai vizsgálatokat (ATLA, 1999).

Az állatkísérleti módszerek követelményeinek optimalizálása és összehangolása, és a vizsgálati eredmények közös elismerése nemcsak a kísérleti állatfelhasználás csökkenését, hanem az alternatív módszerek bevezetésének a felgyorsulását is eredményezheti (Nab és mtsai, 1993).

A FRAME (Fund for the Replacement of Animal in Medical Experiments) brit szervezet által az alternatív módszerek technikája vagy az alkalmazott metodika alapján megállapított osztályozás szerint az alternatív módszerek a következő kategóriákba sorolhatók:

- *in vitro* technikák
- alacsonyabb rendű szervezetek használata
- immun-technikák
- minőségi szerkezet-aktivitás összefüggés analízise
- élettani folyamatok matematikai modellezése
- modellezés emberen
- más alternatív módszerek (Nab és mtsai, 1993).

### ***In vitro* módszerek**

Jelenleg az alternatív módszerek legfontosabb képviselői a szövetkultúrák. A szövetkultúra fogalma különböző technikák széles gyűjteményét foglalja magába, amelyek esetén sejteket, szöveteket, szerveket vagy szervrészeket tartanak életben az élő szervezeteken kívül legalább 24 óráig. Az élő sejtek számára megpróbálnak olyan közeget (környezetet) kialakítani, amely legjobban hasonlít az *in vivo* élettani körülményekhez.

A szövetkultúrák két fő kategóriára oszthatók: organotipikus kultúrákra és sejt kultúrákra. Az organotipikus kultúrák szövet- vagy szervrészeket, ritkán esetleg intakt szervet (pl. embriószervet) tartalmaznak, amelyeket tenyészközegbe helyeznek.

Az organotipikus kultúrák használata esetén a fő cél a sejtek és a szervek szövetei közötti szerkezeti és funkcionális kapcsolatok vizsgálata.

A sejt kultúrák esetén kémiai vagy mechanikai úton felbontják az egyes sejtek közötti kapcsolatokat. A szétosztott sejteket tenyészközegbe helyezve kapják az elsődleges sejt kultúrát. A sejteket egy generáción túl tenyésztve kapják a másodlagos vagy harmadlagos sejt kultúrákat. Az alkalmazott technikától és sejt típustól függően a sejtek tarthatók egy rétegben vagy sejt szuszpenzió formájában. A sejt kultúrákat széleskörben alkalmazzák például a farmakológiában a receptorkötések tanulmányozásakor, gyakran használják őket a vakcina előállításban (Nab és mtsai, 1993).

### **Alacsonyabb rendű szervezetek használata**

Bizonyos esetekben az alacsonyabb rendű szervezetek használatával - mint a baktériumok, penészgombák, rovarok, puhatestűek, kételtűek - csökkenteni lehet a magasabb rendű gerinces kísérleti állatfelhasználást. A baktériumok ilyen irányú fölhasználásának egyik példája az AMES teszt, amelyet a vegyi anyagok mutagenetikai potenciáljának vizsgálatára használnak. Az új gyógyszerkészítmények genetikai információs rendszerre gyakorolt hatását először ezen *in vitro* tesztben vizsgálják (Van Cauteren, 1998). Figyelembe véve a mutagenézis és a karcinogenezis közötti összefüggést az AMES teszt alkalmas arra, hogy jelezze a vizsgálati anyag esetleges karcinogén tulajdonságát. Az AMES tesztet az *in vivo* tesztek elővizsgálati módszereként alkalmazzák, hasonlóan a többi olyan kísérleti módszerhez, amelyek alacsonyabb rendű szervezeteket használnak kísérleti objektumként, mert alkalmas arra, hogy felhívja a figyelmet a vizsgálati anyag toxikus hatásaira, viszont az eredményei, figyelembe véve az ember és a kísérletekben alkalmazott fajok rendszertani távolságát, csak korlátozott információt nyújtanak (Nab és mtsai, 1993).

### **Immunológiai technikák**

Immunológiai technikák képezik az alapját számos *in vitro* módszernek. Alkalmazásuk különösen hasznos diagnosztikumok tesztelésében, vakcinák minőségi ellenőrzésekor és immunológiai

alapkutatásoknál. E terület olyan jól ismert technikákat foglal magába, mint a Enzyme-Linked Immunosorben Assay (ELISA) a Hemagglutinációs teszt és a Radioimmuno Assay (RIA). Ezek az *in vitro* módszerek nagyon érzékenyek, de néhány esetben a specifitás hiánya az antigének vagy az antitestek szétválasztásakor megköveteli az állatkísérletek elvégzését (Nab és mtsai, 1993).

### **Mennyiségi szerkezet-aktivitás összefüggés analízis**

Jól ismert tény, hogy összefüggés létezik a molekulaszerkezet, a fizikai-kémiai tulajdonságok és az illető anyag biológiai aktivitása között. Felhasználva ezt a tényt, lehetőség van arra, hogy megjósoljuk számos új készítmény biológiai aktivitását, például a toxicitást, vagy javítsuk a gyógyszerkészítmények hatékonyságát molekula szerkezetükben eszközölt kisebb változtatásokkal. A módszer alkalmas a továbbiakban arra is, hogy a készítmény sorozatok analizálásakor kiválasztást végezzünk a hatékonyság tekintetében. A nagyszámú készítmény jelöltekből, átesve a szűrővizsgálatokon, csak kevés gyógyszerkészítmény lesz, amelyet azután állatkísérletekben vizsgálnak tovább.

A gyógyszerfejlesztésben a számítógépes modellezést minden esetben *in vitro* és *in vivo* állatkísérleteknek kell követniük. Az elvárt biológiai aktivitáson alapuló elsődleges számítógépes szűrés csökkenti azon készítmények számát, amelyekkel további állatkísérleteket kell végezni (Nab és mtsai, 1993).

## **Élettani folyamatok matematikai modellezése**

Számos, az élő szervezetben lejátszódó biológiai folyamat kifejezhető matematikai egyenletek segítségével, ennek megfelelően sok élettani, biokémiai, patológiai és toxikológiai esemény matematikai modellje kifejleszthető. A számítógépes szimulációk gyakran tapasztalati adatokon alapulnak, ha például a folyamat mechanizmusa nem teljesen ismert, akkor a számítógép készíthet egy olyan szimulációt, amellyel az *in vivo* kísérletből származó ismeretek összehasonlíthatók.

A modellek kifejlesztéséhez szükséges az állatkísérleteken és az emberi tapasztalatokon alapuló *in vivo* folyamatok részletes ismerete. Amennyiben egy teljes modellt akarunk felépíteni minden folyamatot, ami *in vivo* létezik, előre le kell írni.

Abban az esetben, ha sikerülne egy hatékony, teljes modellt fölépíteni, akkor nem indokolná semmi a további állatkísérletek elvégzését. A legtöbb számítógépes modell csak megközelíti a valóságot, ezért egy meghatározott számú állatkísérletre mindenképpen szükség van annak érdekében, hogy a számítógépes modellből származó adatokat kiegészítsük és igazoljuk (Carson, 1986).

## **Emberi modellek**

A legtöbb állatkísérletből származó adatot az embereken alkalmazzák, illetve az emberekre vonatkoztatják. Ez a tény burkoltan arra céloz, hogy a kísérletek és a vizsgálatok legjobb modellje az ember lenne. Az emberi modellek használatának azonban nemcsak etikai,

hanem jogi és gyakorlati akadályai is vannak. Mindazonáltal van néhány olyan eset, amikor az ember használata tesztszervezetként igazolható. Az egyik ilyen példa a gyógyszerfejlesztés. A nemzeti és nemzetközi hatóságok megkövetelik az emberen végzendő biztonsági és hatékonysági vizsgálatokat. Kezdetben az új gyógyszerjelölteket állatkísérletekben vizsgálják, ami csökkenti a humán kockázatot a későbbi klinikai kísérleti fázisban. Ahogy a kísérleti állatok esetén, csak szigorú szabályoknak megfelelően használhatók emberek kísérleti célból. Amikor ilyen klinikai vizsgálatokat végeznek egészséges embereken, csak minimális kockázat fogadható el.

Az emberi önkéntesek alkalmazásakor a fajok közötti extrapolációs probléma nem áll fenn. Az állatkísérletekből származó adatok emberre vonatkoztatása mindig problémát okoz az ember és az állatok között fennálló anatómiai, élettani, biokinetikai és farmakológiai, ill. toxikológiai válaszaik különbözősége miatt. A humán önkéntesek alkalmazásakor ezek a problémák nem merülnek föl, és az eredmények extrapolációját is ugyanazon fajon belül kell megoldani (Nab és mtsai, 1993).

### **Más alternatív módszerek**

A szervezetbe kerülő sokféle készítmény biotranszformáción megy keresztül. A felszívódás, az eloszlás és a kiválasztás is fontos szerepet játszik a potenciális gyógyszer vagy mérgező anyag koncentrációjában a célhelyen. Ezen folyamatok megismerése segíti és

tökéletesíti az állatkísérletekből származó adatok extrapolációját és emberre való alkalmazását.

Egészen mostanáig "invazív" módszereket használtak általánosan a biokinetika tanulmányozására, de jelenleg léteznek új "nem invazív" technikák is. Az egyik ilyen a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) más nevén a Magnetic Resonance Imaging (MRI). Ez a módszer azon a tényen alapul, hogy olyan atomok, mint a szén ( $C^{13}$  izotóp) és a hidrogén atommagja visszatér az eredeti energia szintre az erős mágneses erők egyensúly elmozdító hatását követően, az alapállapotba való visszajutás sugárzás kibocsátásával jár, amely mint sugárzási szignál megfelelő készülékben felfogható (Kucsma, 1995). E technika felhasználásával a biokinetikai folyamatok részletesen megfigyelhetők.

Néhány esetben, vágóhidakról származó szerveket használnak a laboratóriumi állatok helyett. Erre példa a vágóhídról származó szarvasmarha szemek *in vitro* szemirritációs vizsgálatokban való felhasználása, helyettesítve a nyúlön végzendő Draize-féle rutin toxikológiai szemirritációs vizsgálatot. A nyúlön végzendő szemirritációs vizsgálat néhány paramétere nagyon jól szimulálható vágóhídról származó izolált borjú (vagy csirke) szem használatával (Nab és mtsai, 1993).

### **3.2 A chorioallantois membrán felhasználása a szemirritáció vizsgálatában**

A chorioallantois membránt már hosszú ideje használják a biológiai kutatások különböző területein, beleértve a virológiai-, bakteriológiai- és tumorkutatásokat (Beveridge és Burnet, 1946). A csirkeembriót, mint tesztobjektumot gyakran alkalmazzák a különböző vegyi anyagok toxikus és teratogén hatásának becslésére (Verrett és mtsai, 1980; Fisher és Schoenwolf, 1983). A chorioallantois membrán felhasználása az *in vivo* szemirritáció meghatározására viszonylag új keletű (Leighton és mtsai, 1983, 1985; Luepke, 1985; Parish, 1985).

A különböző vegyi anyagok irritáló hatásának becslésére jó modellként ígérkezik az embrionálódott tyúktojás chorioallantois membránja (CAM), mivel vérerekkel gazdagon átszőtt és viszonylag könnyű hozzáférni mind a kezelések alkalmával, mind az értékeléskor. Több módszer is használja a CAM-ot a szemirritáció becslésére. Az egyik az, ahol megkísérelték a Draize-féle szemirritációs tesztet teljes egészében helyettesíteni a CAM módszerrel. A másik kutatási terület az, amelyik a CAM-ot a gyulladást okozó hatások potenciális modellezésére próbálja használni.

A vizsgálatok első területe további két különböző módszerre osztható: 1. A tesztanyag érintkezési ideje a CAM-mal meghosszabbított, és ennek megfelelően a megfigyelés is hosszabb idejű (Leighton és mtsai, 1983; Leighton és mtsai, 1985). 2. A tesztanyag nagyon rövid ideig

érintkezik a CAM-mal, és a véredényrendszerben bekövetkező változásokat közvetlenül a kezelés után értékelik (Luepke, 1985).

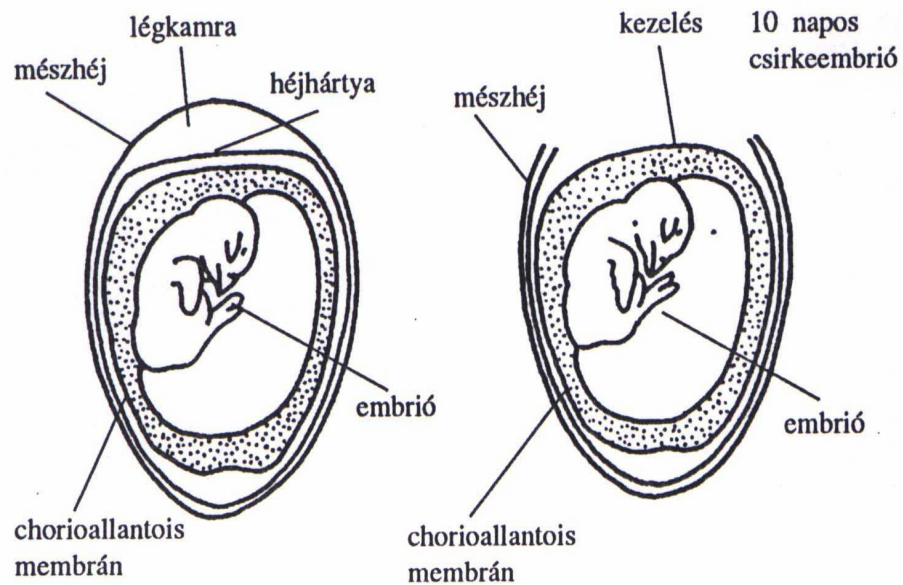
A vizsgálatok második területén a membránon megfigyelhető gyulladásos elváltozások és a kötőhártyán gyulladást okozó hatások korrelációjának a feltárása a cél. Meghosszabbított kezelési időt és makroszkopikus értékelést használnak, amely utóbbit, a kezelések után több időpontban végezik, vizsgálják továbbá a szövettani károsodásokat is (Parish, 1985).

A CAM-ot használó módszerek lényege, hogy a következő fejezetben (2.2.1.) részletezett eljárások valamelyike szerint előkészített membránt kezelik a vegyi anyaggal, majd értékelik az azon jelentkező elváltozásokat. A CAM kezeléséhez szükséges behatolás a légkamrán vagy a tojás egyenlítőjén keresztül is elvégezhető.

### **3.2.1. A tojások előkészítése**

#### **3.2.1.1. A légkamrán keresztüli behatolás**

Amikor a CAM kifejlődött – a keltetés 10. napja körül – a tojás héját a légkamra fölött kis cirkulációs fűrésszel vagy ollóval óvatosan eltávolítják, a héjhártyát óvatosan elmozdítják, és ekkor feltárul a CAM. Az így elkészített tojás (1. ábra) már alkalmas a kezelésre (Luepke, 1985).



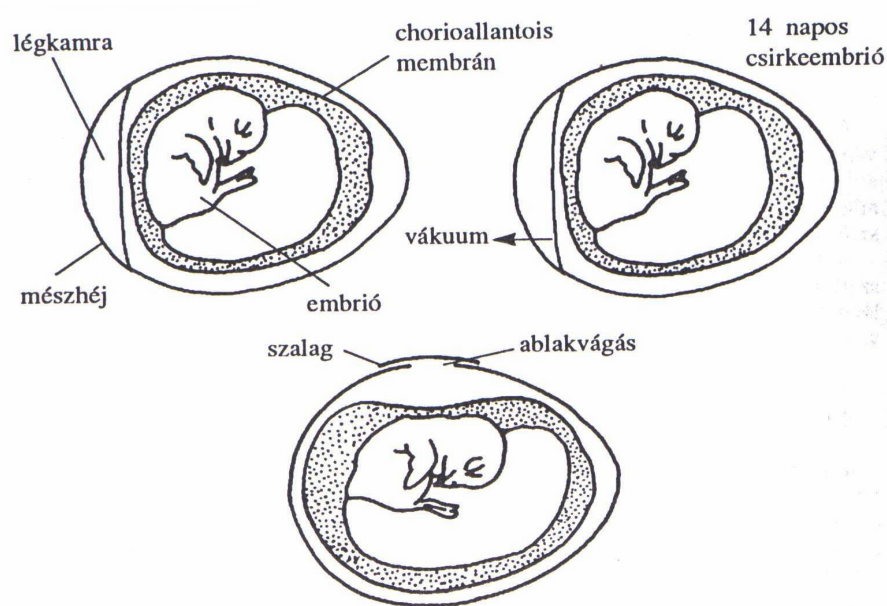
**1. ábra A légkamrán keresztüli behatolás**

### **3.2.1.2. Behatolás a tojás egyenlítőjén át**

#### ***Kilyukasztott membrán módszer***

Kis lyukat fűrnak a héjon a tojásegyenlítői síkjában a keltetés 14. napján, vigyázva, hogy ne okozzanak károsodást a héjhártyán. A héjhártyát óvatosan átszúrják tűvel, elkerülve a CAM károsodását, amely közvetlenül a héjhártya alatt található. A második lyukat a méshéjon

keresztül a légkamrába fúrják és a levegőt vákuum segítségével kiszívják. Ablakot vágnak a tojás egyenlítői síkjában, hogy megkönnyítsék a behatolást a kezeléshez és az értékeléshez (2. ábra). Az ablakot ezután öntapadó szalaggal, a lyukat pedig valamilyen kocsonyás anyaggal fedik le (Lawrence, 1987).

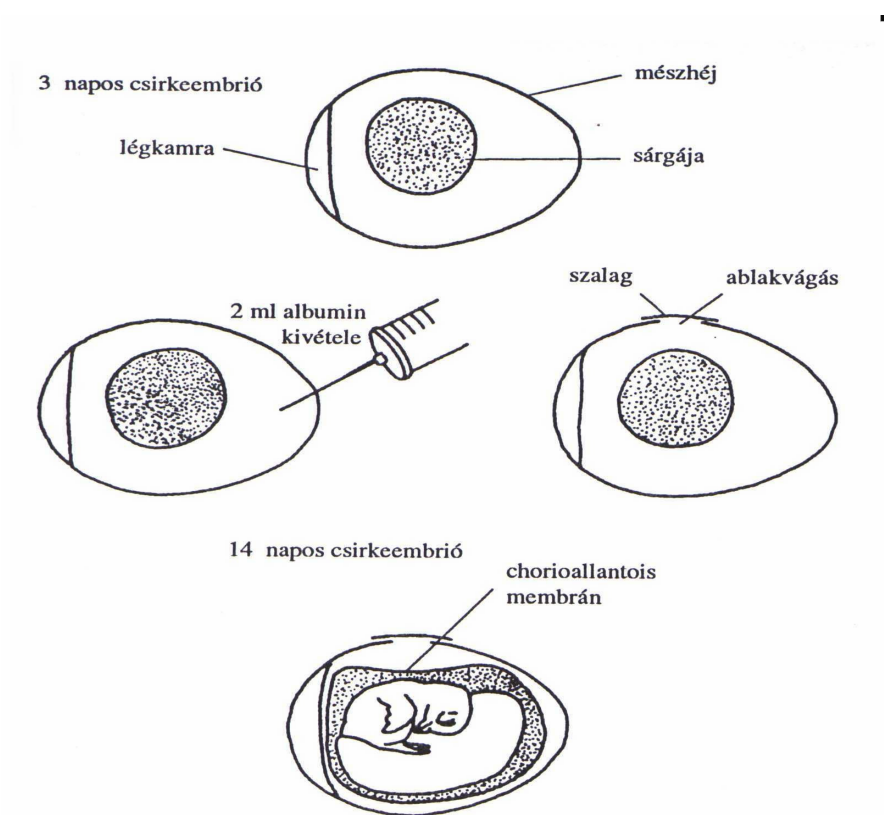


**2. ábra Kilyukasztott membrán módszer**

### ***Zwilling-technika***

Az inkubáció 3. napján kis lyukat fúrnak a tojás hegyes végén a méshéjon. Az albuminból 2 ml-t eltávolítanak fecskendő és egy tű

segítségével, majd a nyílást fedik. Ablakot vágnak az előző módszerhez hasonlóan az egyenlítői síkban, majd öntapadó szalaggal lefedik. A tojást ezek után visszahelyezik az inkubátorba (3. ábra). A CAM tovább fejlődik az albumin redukált szintjén, a kezelést és az értékelést az ablakon keresztül végzik (Zwilling, 1959).



**3.ábra A Zwilling-technika**

### **3.3. A kísérleti körülmények között vizsgált vegyi anyagok hatása a tyúktojás chorioallantois membránjára**

Az 1980-as évek folyamán az állati jogokkal foglalkozó szervezetek egyre nyomatékosabban emelték fel a szavukat a szemirritáció vizsgálatára használt Draize-féle tesztben alkalmazott kísérleti nyulak szenvedései ellen. Az állami hatóságok és az egészségvédelem területén tevékenykedő ipari szervezetek vezetésével megindult egy olyan kutató jellegű folyamat, amely célként tűzte ki a Draize-féle szemirritációs vizsgálat új, alternatív módszereinek kifejlesztését (Christian és Diener, 1996).

A bőrirritációs vizsgálatok felhasználása a szemirritációs tesztek helyettesítésére nem bizonyult megbízható megoldásnak (Gilman és mtsai, 1983). Williams (1984) erősen bőrirritatív vagy korrozív vegyi anyagok Draize-féle módszerrel meghatározott szem- és bőrirritációs eredményeit hasonlította össze. Az összehasonlító vizsgálatok kedvezőtlen eredményei alapján megállapította, hogy a bőrirritációs tesztek eredményei nem használhatóak a szemirritációs potenciál meghatározására.

Talsma és mtsai (1988) arról számoltak be, hogy a Draize-féle teszt által megkövetelt állatlétszám csökkentése - az előírt 6 kísérleti nyúlra 3-ra - nem eredményezi az *in vivo* teszt megbízhatóságának csökkenését. Seabaugh és mtsai (1993) a szem helyi anesztetikumok felhasználását javasolták a kísérleti nyulak fájdalmainak csökkentésére. Lambert és mtsai (1993) a Draize-féle teszt által előírt kezelési

koncentrációk tized részét alkalmazták az általuk vizsgált 22 vegyi anyag szemirritációs potenciáljának meghatározására. A kapott eredmények nagyon jó korrelációt mutattak a klasszikus Draize-féle teszt eredményeivel.

A kutatások főirányát azonban azon *in vitro* tesztek kifejlesztése jelentette, amelyek alkalmasak lehetnek a Draize-féle teszt kiváltására. Számos *in vitro* módszert dolgoztak ki az *in vivo* teszt helyettesítésére, a perspektivikus alternatív módszerek a következő csoportokba sorolhatók:

- nyúl és szarvasmarha szemmel és szemrészekkel végzett vizsgálatok,
- citotoxicitási vizsgálatok,
- chorioallantois membránt felhasználó vizsgálatok,
- biokémiai vizsgálatok (Walum és mtsai., 1992)

Leighton és mtsai (1985) a tyúktojás chorioallantois membránját használták az általuk kidolgozott vizsgálati módszerben a vegyi anyagok által okozott gyulladásos reakciók osztályozására. A szerzők a CAM-ot a Zwillling-módszer szerint készítették elő, a keltetés 14. napján kezelték különböző háztartási vegyi anyagokkal, amit egy 10 mm átmérőjű teflon gyűrűbe helyeztek a kezelés helyének lokalizálása érdekében. A makroszkopikus reakciókat a keltetés 17. napján értékelték, majd szövettani vizsgálatához mintát vettek a kezelt CAM-ból. A szövettani vizsgálat eredményei jó korrelációt mutattak a makroszkópos elváltozásokkal. Az *in vitro* vizsgálati eredményeiket összehasonlították a Draize-féle tesztből származó eredményekkel. Az összehasonlítás

eredményeként az *in vitro* chorioallantois membránt használó teszt eredményei jó korrelációt mutattak az *in vivo* adatokkal.

Luepke és mtsai (1986) egy közleményben számoltak be az általuk kifejlesztett HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) teszt gyakorlati eredményeiről. 190 különböző vegyi anyagot és készítményt vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy az *in vitro* tesztből származó eredmények a Draize-féle szemirritációs teszt eredményeivel összehasonlítva jó korrelációban állnak egymással. A szerzők rámutatnak arra, hogy a HET-CAM teszt nem képes teljes egészében az emlős tesztek felváltására, de csökkenthetik az emlős kísérleti állatok felhasználását.

Luepke és mtsai (1987) az általuk addig elvégzett *in vitro* HET-CAM tesztek eredményeiről számoltak be. Megállapították, hogy az elektronmikroszkópos értékeléssel kiegészített HET-CAM tesztből származó eredmények jó korrelációt mutatnak az *in vivo* eredményekkel. Az *in vitro* adatok reprodukálhatósága nagyon jónak bizonyult (>94%) mind a különböző vizsgálati időpontokat, mind a különböző GLP minősített vizsgálóhelyeket illetően. A szerzők javasolják jól ismert irritációs potenciálú referencia anyagok használatát, és a válaszreakciók értékelését segítő leírójellegű standard reakciókat bemutató fotóatlaszok alkalmazását.

Lawrence és mtsai (1990) 34 különböző karakterű ipari és kozmetikai vegyi anyag irritációs potenciálját vizsgálták a Luepke által kidolgozott CAM teszttel. A tesztanyagokat töményen jutatták a 10 napos embrionálódott tyúktojás chorioallantois membránjára, 20 másodperces expozíciót követően kiöblítették a vizsgálati anyagokat. A

kezelést követően a membránt 5 percig figyelték és értékelték a lízis és a vérzések kialakulását. Összehasonlították az *in vitro* eredményeket az ismert *in vivo* eredményekkel, és azt tapasztalták, hogy a különböző kémiai karakterű anyagokat együttesen értékelve korlátozott mértékű az *in vitro* és az *in vivo* eredmények közötti korreláció. Jobb korrelációt csak hasonló típusú vegyi anyagok összehasonlítása esetén figyeltek meg. Vizsgálataikból azt a következtetést vonták le, hogy a CAM teszt elővizsgálati módszerként vagy egy *in vitro* tesztrendszer elemeként csak korlátozott mértékben használható fel.

Van Erp és mtsai (1990) ipari vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározására elővizsgálati módszerként egy olyan *in vitro* tesztrendszert dolgoztak ki, amely egyrészt a szaruhártya-károsodások vizsgálatára az izolált szarvasmarha szemet (BE), másrészt a kötőhártya-károsodások vizsgálatára a tyúktojás chorioallantois membránját (CAM) használja fel. A vizsgálati anyagok tesztelése során az izolált marhaszemen értékelték a kezelés hatására kialakult szaruhártyahomály mértékét és az epitheliális károsodásokat. A CAM esetében pedig a vérérrendszerben a kezelések eredményeként bekövetkezett károsodásokat. A két *in vitro* tesztből álló tesztrendszert BECAM módszernek nevezték. Közel 150 vegyi anyagot vizsgáltak ezen tesztrendszerben, az *in vitro* eredményeket összehasonlítva az *in vivo* adatokkal jó korrelációt tapasztaltak, csupán a kísérleti anyagok 5 %-a mutatott teljes eltérést az *in vitro* és az *in vivo* értékelés során. A szerzők megállapították, hogy a BECAM vizsgálati módszerrel nem vagy enyhén irritatívnak minősített anyagokat nem kell veszélyt jelző címkével ellátni, míg irritatívabb anyagoknál csökkentett állatlétszámú emlős

tesztek elvégzésével nyerhetőek további irritációs adatok az EGK (Európai Gazdasági Közösség) által megkövetelt címkézéshez. A szerzők javasolják a laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálatok elvégzését a BECAM vizsgálati módszerrel.

Blein és mtsai (1991) 40 vegyi anyag vizsgálatát végezték el a HET-CAM teszttel. A vizsgálati anyagok különböző vegyi anyag csoportok képviselői voltak (oldószerek, savak, lúgok, felületaktív anyagok). Az *in vitro* eredményeket összehasonlították az általuk elvégzett *in vivo* Draize-féle vizsgálat eredményeivel. Az összehasonlítás eredményeként megállapították, hogy az *in vitro* HET-CAM teszt adatai jó korrelációt ( $r = 0,670$ ) mutattak az *in vivo* adatokkal. A tömény vegyi anyagok vizsgálati eredményeinek összehasonlításából kitűnt a HET-CAM teszt túlérzékenysége, ami következtében a különböző toxicitási fokozatok szétválasztását nem tudták elvégezni. A vizsgálati anyagok tízszeres hígításával elvégzett *in vitro* tesztek esetén tovább javult az *in vivo* és az *in vitro* eredmények korrelációja, és a különböző irritációs kategóriák is jobban elkülönültek. Megállapították, hogy bizonyos színes és zavaros vizsgálati anyagok esetében az *in vitro* HET-CAM teszt nem használható az irritáció meghatározására.

Bruner és mtsai (1991) 17 háztartási vegyi anyag, tisztító szerek, szappanok és samponok irritációs vizsgálatát végezték el az *in vitro* BECAM tesztrendszerrel, amelynek egyik eleme egy chorioallantois membránt használó teszt, másik eleme egy izolált marha szemet használó teszt. Az *in vitro* és az *in vivo* eredmények összehasonlítása során gyenge korrelációt figyeltek meg, és arra a következtetésre jutottak, hogy a BECAM módszer nem használható olyan vegyi anyagok irritációs

potenciáljának meghatározására, amelyek az ő általuk kísérletbe vont vegyi anyagokhoz hasonlóak.

Rougier és mtsai (1992) 41 nedvesítő szer és kozmetikai termék irritációs potenciálját határozták meg HET-CAM teszttel. Az *in vivo* eredményekkel elvégzett összehasonlító vizsgálatok alapján megállapították, hogy az *in vitro* eredmények nagyon jó korrelációt ( $r = 0,96$ ) mutattak a Draize-féle tesztből származó *in vivo* irritációs adatokkal.

Bagley és mtsai (1992, 1994a) öt különböző *in vitro* teszt segítségével - köztük a CAMVA (Chorioallantoic Membrane Vascular Assay) és a HET-CAM vizsgálati módszerekkel - meghatározták 32 háztartási vegyi anyag irritációs potenciálját. Öt különböző laboratórium között végzett összehasonlító vizsgálat eredményeként a CAM-ot használó kísérleti módszerek kitűnő reprodukálhatóságát figyelték meg. A vizsgálati eredmények összehasonlítását követően, mind a CAMVA, mind a HET-CAM teszt esetében megállapították, hogy *in vitro* eredmények jó korrelációt (CAMVA teszt  $r = 0,68$ , HET-CAM teszt  $r = 0,77$ ) mutatnak *in vivo* adatokkal.

Spielmann és mtsai (1993) a szemirritáció vizsgálatára javasolt *in vitro* módszerekkel végzett összehasonlító német laborvizsgálatok során a HET-CAM teszttel nagyon jó eredményeket kaptak. Az *in vitro* HET-CAM tesztből származó adatok nagyon jól korreláltak az *in vivo* irritációs adatokkal. A szerzők megállapították, hogy az általuk elvégzett érvényesítő vizsgálatok jelzik az *in vitro* HET-CAM teszt perspektivikus pozitív értékét a primer szemirritáció vizsgálatára alternatív módszerként.

Bagley és mtsai (1994b) a chorioallantois membránt felhasználó CAMVA (Chorioallantoic Membrane Vascular Assay) teszt módosított változatának az eredeti vizsgálati módszerrel végzett összehasonlító vizsgálatának eredményeiről számoltak be. A standard CAMVA teszt 14 napos tyúktojás CAM-ját használja tesztobjektumként, ami problémát okoz ezen vizsgálati eljárás alternatív módszerként való elfogadtatásában. A Brit Állatvédelmi Törvény (1986) szerint azon embriók, amelyek az embrionális fejlődés félidejét elérték magasabb rendű kísérleti állatnak tekintendők, azaz azon vizsgálati módszerek, amelyek ilyen korú embriókat használnak fel már *in vivo* tesztek. A német szabályozók szerint a tojás 10 napos koráig élelmiszer kategóriába tartozik, így azok a vizsgálati módszerek (pl. HET-CAM teszt), amelyek 10 napos korú tojást használnak az *in vivo* tesztek alternatív metodikáinak minősülnek. A német hatóságok elfogadják a chorioallantois membránt felhasználó *in vitro* módszerek felhasználását az erősen irritatív anyagok (R 41) meghatározására. A nem irritatív (R 36) anyagok esetén az *in vitro* eredményeket, *in vivo* tesztekéből származó eredményekkel is meg kell erősíteni. Az eredeti CAMVA teszthez képest - ahol 14 napos CAM-ot használnak - megváltoztatták a kísérleti objektum (CAM) korát és 10 napos korú tojást használtak fel. Az eredeti és a módosított CAMVA tesztekéből származó eredményeket összehasonlították, és azt a megállapítást tették, hogy a fiatalabb korú (10 napos) CAM felhasználása tesztobjektumként nem befolyásolja az *in vitro* eredmények jó korrelációját az *in vivo* eredményekkel. A 10 napos korú tojás felhasználása nagyban hozzájárul a CAMVA teszt alternatív módszerként való elfogadtatásához.

Ohno és mtsai (1995) beszámoltak a japán egészségügyi hatóságok által a Draize-féle *in vivo* teszt alternatíváiként szóba jöhető 12 féle *in vitro* módszerrel – köztük a HET-CAM teszttel - elvégzett összehasonlító vizsgálatok eredményeiről. A vizsgáló laboratóriumok közötti eredményekből meghatározott variabilitás szempontjából a HET-CAM teszttel kapták a legjobb eredményeket. Az *in vitro* és *in vivo* eredmények összehasonlítása során a HET-CAM tesztből származó adatok jó korrelációt mutattak az *in vivo* adatokkal. A korreláció tovább javult, amikor a por alakú készítményeket kiemelték a vizsgálati anyagok köréből. Összefoglalóan megállapították, hogy egyetlen *in vitro* módszer sem alkalmas általánosan a különböző típusú vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározására, erre a célra csak különböző *in vitro* módszerekből álló *in vitro* tesztrendszer lehet alkalmas.

Sina és mtsai (1995) 37 szintetikus gyógyszer intermedier irritációs potenciálját határozták meg azon 7 féle különböző *in vitro* vizsgálattal, amelyek az irodalom alapján a legjobb eredményeket adták az *in vivo* Draize teszttel történt összehasonlítások során. Ezen *in vitro* tesztek között szerepelt egy chorioallantois membránt felhasználó *in vitro* vizsgálati módszer a CAMVA (Chorioallantoic Membrane Vascular Assay). Az *in vitro* tesztekben származó eredményeket összehasonlították az *in vivo* Draize tesztből származó eredményekkel. A CAMVA módszer esetén a tojásokat a keltetés 4. napján készítették elő, úgy, hogy kicsiny ablakot vágtak a méshéjra, eltávolították a héjmembránt a CAM fölé, majd a nyílást lefedték, és a tojásokat tovább keltették. A kezelést a keltetés 14. napján végezték el, a vízben vagy szójaolajban oldott vizsgálati anyagokat a CAM-ra helyezett teflon gyűrűbe cseppentették,

majd a kezelést követő 30 perc múlva értékelték a vérrendszerben bekövetkezett változásokat. Az *in vitro* és *in vivo* tesztek eredményeinek összehasonlításából arra a következtetésre jutottak, hogy mivel a chorioallantois membránt használó CAMVA módszerből származó adatok jó korrelációt mutatnak az *in vivo* adatokkal, ezért ezen módszer irritációs elővizsgálati módszerként jól felhasználható.

Spielmann és mtsai (1996) a BGA (Bundesgesundheitsamt) és a BMBF (German Department of Research and Technology) által koordinált két ígéretes alternatív *in vitro* szemirritációs teszt német laboratóriumok között végzett összehasonlító vizsgálatát értékelték. Az érvényesítő vizsgálat során a szerzők azt a megállapítást tették, hogy az összehasonlító vizsgálatok során alkalmazott 3T3 NRU (3T3 egér fibroblast sejtekkel végzett Neutral Red Uptake) és a HET-CAM teszt kombinálva egy vizsgálati rendszerben megbízhatóan alkalmazható az erősen irritatív anyagok (R 41) osztályozására.

Christian és Diener (1996) szemleciikkben foglalták össze azokat a legfontosabb publikációkat, amelyek a perspektivikus *in vitro* módszerek és az *in vivo* tesztek közötti összehasonlító vizsgálatok eredményeit mutatják be. A chorioallantois membránt felhasználó tesztek (HET-CAM, CAMVA) is azon *in vitro* módszerek közé tartoznak, amelyek ha önmagukba nem is, de más *in vitro* módszerekkel kombinálva, *in vitro* tesztrendszerként felhasználhatók a szemirritációs potenciál meghatározására. Az irritatív hatásra a CAM vérrendszerében bekövetkező változások jól modellezik azokat a károsodásokat, amelyek a kémiai irritáció hatására alakulnak ki a szem kötőhártyáján. Egy

objektívebb kiértékelő módszer kidolgozása tovább javítaná a CAM-ot használó tesztek gyakorlati alkalmazhatóságát.

### **3.4. A házityúk embrionális fejlődése**

A megtermékenyülés eredményeként létrejött zigóta barázdálódásával megkezdődik az embriófejlődés. Ennek első szakaszát – ami még a megtojás előtt a petevezetőben zajlik le – korai embriófejlődésnek nevezzük. A barázdálódás nyomán a csíralemezek két sejtrétege jön létre: az ectoderma és az endoderma. Ez a folyamat a gastrulatio, ami a megtojásig tart.

A tyúkembrió keltetés alatti fejlődésének két szakaszát különböztetjük meg:

- a 8-9. napig tartó embrionális szakaszt, amelyben a gyors, elsősorban minőségi változások eredményeként valamennyi szerv, szervkezdemény, végtag kifejlődik.
- Az ezt követő magzati időszakot, amelyet a mennyiségi fejlődés jellemez, az embrió fokozatosan felveszi végleges formáját (Bogenfurst, 1995).

A keltetés első napjaiban az intenzív fejlődés a jellemző, a csírákorong megnyúlik és az ectoderma lemezen kiemelkedő sejtvastagodás, az őscsík alakul ki. Az őscsík fázisban az ectoderma és az endoderma között kialakul a mezoderma. Ebből a három rétegből jönnek létre a különböző szövetek és szervek. Az őscsík mindkét oldalán

megjelennek a szomiták (gerinchúri összelvények), amelyekből a csontozat és az izomzat fejlődik ki. Az első nap eseményeihez tartozik a gerincoszlop, az idegrendszer és a szemek szervezdeményeinek létrejötte.

A második nap során kezdődik a szív és a véredények fejlődése, a véredényhálózat a szikre fekszik. A szív megkezdí működését, az üregrendszer folyadékkal telik meg, megindul a véráramlás. A második nap végére az idegrendszer alapját adó velőcső zárul, amelynek elülső szakaszából alakul ki az agy, a hátsó szakaszából a gerincvelő fejlődik. Fejlődésnek indulnak az extraembrionális – az embrióon kívüli – hártýák is. Az ecto- és mezoderma fali lemeze elülső, hátulsó és két oldalsó amnion redőt képez, amely az embriót körbeölelve zárul az amnionvarratban craniocaudalisan.

A teljes záródást megelőzően azonban a harmadik napon az emésztőkészülék, az érzékszervek indulnak fejlődésnek. Kialakulnak az agyvelő idegek kezdeményei és a farki rész kivételével mindenütt az összelvények. A nap végén megjelennek a végtagbimbók, illetve a szárnyak és a hátsó végtagok kezdeményei, valamint a zsigerívek. Az allantois, húgytömlő belenő az extraembrionális testüregbe (Zboray, 1991).

Az allantois erei a köldökvénák és a köldök artériák, amelyek – a szíktömlő vérkeringését felváltva – az embrionális keringést adják. Az allantois az embrió légzőszervéül is szolgál, ezen kívül a közben az ősvese által kiválasztott vizelet is az allantoisba jut: az allantois tehát mint vizelettömlő, az allantois járat, mint a vizeletcső szerepel. Itt gyúlik össze az ősvese által kiválasztott vizelet is (Kovács és Fehér, 1966).

A negyedik napon az érrendszer jól kivehető, minden testrészt megjelenik. Megkezdődik a nyelv kialakulása. A farki részben megtalálhatók az összelvényeken, megjelennek az ivarmirigyek. Az embrió feje az agyvelő gyors fejlődése következtében jelentősen megnő.

Az ötödik napon a szaporító szervek differenciálódnak. Az agy és az idegrendszer tisztán kivehető, a szív még az embrió testén kívül van. Az allantois terjedelmes zsákká nő. Differenciálódik az elülső és hátulsó végtag, az ujjak, az agyvelő. A máj fejlődni kezd.

A hatodik napon a csontos váz kezdeménye porcossá válik, a végtagok tovább tagolódnak. Kialakulnak a csőr kezdeményei és a szem hatalmasan megnő. Az allantois a héjhártyák közvetítésével a méshéjjal kapcsolatba lép, megindul az allantois légzés.

A hetedik napon a lábak kezdeménye erőteljesebben fejlődik, az embrió teste hosszabbodik.

A nyolcadik napon a csőr felső és alsó kávájának kezdeményei elkülönülnek. A toll kezdemények láthatók, a jobb oldali petefészek redukálódik.

A kilencedik napon a vázizomzat intenzíven fejlődik, a mellcsont kialakul, az embrió csirkeformát vesz fel. A szív a testbe záródik.

A tizedik napon megkezdődik a csontozat mineralizálódása, a végtagok izmai erőteljesen növekednek. Az allantois eléri maximális fejlettségét, savósburk egész területén szétterül, a tojás egész tartalmát körülfogva zárul.

A tizenegyedik és tizenkettedik nap több szempontból is változásokat eredményez az embrió további fejlődésében. Ez idáig az embrió a szénhidrát és fehérje készletből gyarapodott, de a tizenkettedik

nap után a szikér hálózat által átalakított lipidek felvétele intenzívvé válik. (Speake és mtsai, 1993). A csontosodási folyamathoz szükséges kalcium felvétel feltételei a tizenkettedik napra valósulnak meg. Ekkorra a CAM (chorioallantois membrán) képessé válik a kalcium szállítására a tojáshéj és az embrió között és biztosítja a megfelelő növekedést (Dieckert és mtsai, 1991) Ekkorra megemelkedik a Ca-dependens ATP-áz szintje, mely fontos eleme a Ca felvételnek a tojás mészhéjából (Dieckert és mtsai, 1992). Az allantois ekkora éri el teljes fejlettségét, mely már a keltetés hetedik napjától részt vesz az allantois kialakításában egészen a tizenkilencedik napig, a tüdőlégzésre történő átállásáig.

A chorion már fuzionált a héjhártyával, belső fele úgy szintén az allantoisszal, ezzel létrehozva a chorioallantois membránt. A tizenkettedik-tizenharmadik napra az embrióban kifejlődtek a szervek.

A tizenharmadik napon a bőr egész felületét pikkelytollak fedik, a lábközépen és a lábujjakon megjelennek a szarupikkelyek kezdeményei, a csőr elszarusodik, az emésztőkészülék teljesen kifejlődve működni kezd.

A tizenhetedik naptól az embrió megkezdí a készülést a tüdőlégzésre való áttérésre.

A tizenkilencedik napon a tojásfehérje teljes egészében felszívódik, a vázizmok tömege nő. Megindul a szikzacskó behúzódása a testüregbe, majd a kelés előtt 2 órával a fokozatosan záródó köldökgyűrűn át a hasüregbe húzódik.

A huszonegyedik napon a tojáshéj törékennyé válik annak következtében, hogy a mész egy része felszívódik, és a csontokban rakódik le. Az allantois összeszárad, vérerei elhalnak. A csőr a törzs és a

szárny között a légkamrahártyáját átlöki és a csirke a kelésig tüdővel lélegzik miközben csipoghat is (Kovács és Fehér, 1966).

#### **3.4.1. Az embrionális membránok**

A blasztoderma kiterjeszkedése a tojássárgája felett nagyon gyorsan zajlódik le a keltetés 4. napjáig, erre az időszakra a tojássárgájának egy kis körülhatárolt fedetlen területe marad, amelyet köldöknek neveznek. A köldök hosszú ideig fedetlen marad, végső záródása az albumin tömlő kialakulásával kapcsolatban történik meg. A keltetés első néhány napja során az albumin gyorsan vizet veszít, és viszkózussá válik. Az embriót tartalmazó amnion tömlő felül fekszik, az amnion tömlő alatt helyezkedik a tojássárgája és az albumin nagy része az embrió farki végének irányában fekszik. Az allantois gyorsan terjed az embrionális testüregbe, amikor eléri a tojás alsó pólusát, elkezdi magát körbefoglalni az ott összegyűlemllett albumin viszkózus tömege körül. A gyorsan záródó albumin tömlő a tojássárgája külső oldalát alakítja és a kettő egyesül a tojássárgájának köldöke körül. Ez a kapcsolat sohasem szakad meg és az albumin tömlő maradékai a tojássárgájával együtt a testüregbe húzódnak az inkubációs idő vége felé. A sero-amniotikus kapcsolatnak nagyon fontos hatása van az embrionális membránok általános elrendeződésében. Az albumin tömlő, ami a chorion megkettőződésével formálódik, meghosszabbodik egy csőszerű elvezetéssel a sero-amniotikus lemezig. Az utóbbi perforálódik a 11. nap után és így közvetlen kapcsolat alakul ki az albumin tömlő és az amnion ürege között (Hamilton, 1952).

### *Az allantois*

Az allantois falának azon részét, amely a chorionnal egyesül chorioallantoisnak nevezik, az allantois tömlőjének többi része alkotja a belső falat. Az allantois közbenső distalis része a chorionnal specializálódik az albumin tömlő falaként. Amikor az embrió a bal oldalán fekszik, akkor az allantois az embrió jobb oldalán nő, és egyesül a chorionnal a keltetés első századik órája körül. Ezután gyorsan nő az embrió körül, és az 5. nap végén az embrió több mint felét beborítja. A keltetés 6. napjának végére az allantois teljesen körbe veszi az embriót. A 8. nap végére az allantois a szik felét borítja. A 9. nap végére megkezdődik az albumin tömlő formálódása. Az inkubáció 11. napjának végére az albumin tömlő gyakorlatilag záródik a tojás alsó pólusánál. A 12. napon az albumin tömlő teljesen záródott, és tartalma a 16. napra teljesen felszívódik (Hamilton, 1952).

### *Az amnion*

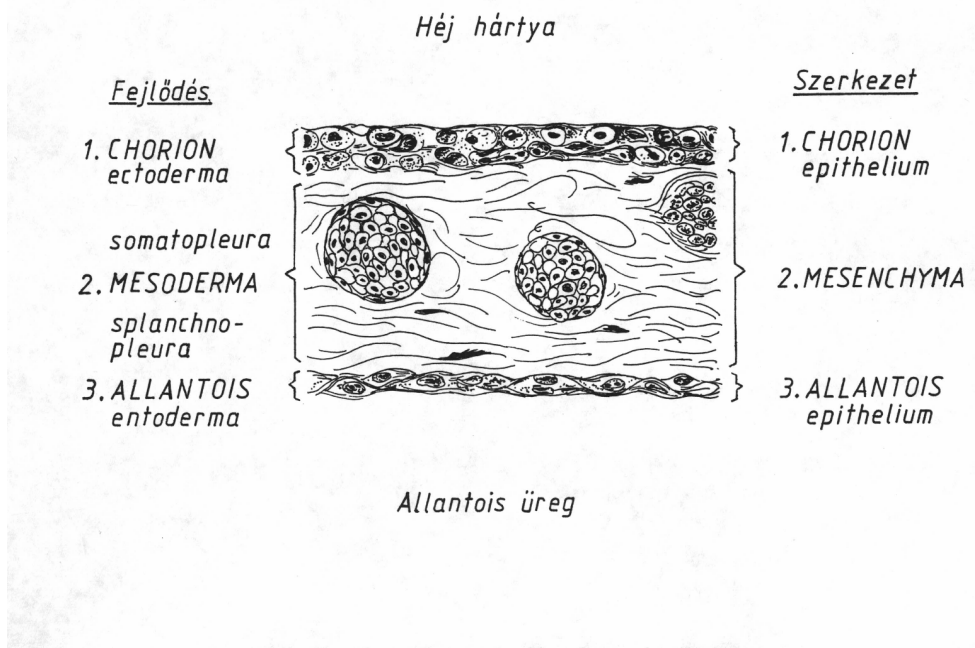
Az amnion szorosan körbezárja az embriót a formálódásának idején, majd rögtön azután folyadék kezd akkumulálódni az amnion üregébe. Az amnion üreg megnagyobbodik, így az embrió egy folyadékkal telt térben fekszik, ami a keltetés folyamán növekszik, majd újra csökken, és az embrió elfoglalja az üreg nagy részét. Orsóalakú izomrostok jelennek meg az amnion falában a keltetés 4. napjától. A 10. napon az izomsejtek összekapcsolódnak, és az allantois mezodermális falai az amnionnal egyesülnek. Röviddel azután, hogy az izomrostok

megjelennek megkezdődik az amnion perisztaltikus összehúzódása. Az összehúzódások spontán eredetűek és ritmikusak. Az amnion összehúzódásának frekvenciája a 8. napig növekszik, majd gyorsan csökken, és a 13. napra megszűnik. Az amnion ásványisókban gazdag környezetet biztosít az embriónak, így védve az embriót a kiszáradástól. Védelmet nyújt az embrionális membránok összetapadása ellen is. Az amnion biztosítja azt a felületet, amelyen az allantois terjeszkedhet és jelentősen növeli a respirációs felületet. Az amnion és folyadéka biztosítja, hogy az embrió a gravitáció ellenére „úszik” a tojásban, és védelmet nyújtanak a rázkódások ellen is (Hamilton, 1952).

#### **3.4.2. A chorioallantois membrán szerkezete**

Az inkubáció 11. napja után a chorioallantois három rétegű. A külső réteg a héjhártyával érintkező ectodermális eredetű hámréteg. A középső réteg embrionális kötőszövet, a mesenchyma, amely a somato- és a splachnopleurából fejlődik. A belső réteg az entodermából származó allantois-hám (4.ábra) (Fáncsi és Fehér, 1978).

A csirke magzat chorio - allantois membránja



**4.ábra A chorioallantois membrán szerkezete**

*1., Chorion (membrana serosa)*

A chorion hámja kötőhámsejtekből áll, két réteget alkot. A külső - héjhártya felőli - hámsejtréteg lap vagy alacsony köbhámsejtekből áll. A belső -mesenchyma felőli - a réteget magasabb köbhámsejtek alkotják. A kapillárisok egy része a két hámsejtréteg között, más része a külső hámsejtréteg és a héjhártya alatt helyeződik. Ez utóbbiak tág öblöket, sinusokat képeznek (Fáncsi és Fehér, 1978).

## *2. Mesenchyma*

A parietalis mesoderma somato- és splanchnopleurája a chorioallantois kialakulásakor összeolvadva egymással egységes mesenchyma-réteget képez. A mesenchyma csillag alakú sejtjei hosszúak, nyúlványosak. A mesenchyma héjhártya felőli rétegében szűk és vékonyfalú, az allantois közelében tág ereknek haladnak. (Fáncsi és Fehér, 1978).

## *3. Allantois*

Az allantois egyrétegű laphámsejtekből áll. Az intercelluláris rések helyenként járatokat alkotnak, amelyekbe vaskos, hosszú, esetenként elágazódó bolyhok nyúlnak be. Az allantois hámsejteknek a tömlő ürege felé tekintő felületén rövid, vaskos nyúlványok, bolyhok és invaginációk találhatók (Fáncsi és Fehér, 1978).

### **3.5. A szem fölépítése**

A szemet a külső behatásoktól a csontos szemüreg, a szemöldök, a szemhéj, a szempilla és a kötőhártya védik. Ez utóbbi egy vékony nyálkahártya, mely a szemhéjakat béleli és a szemgolyó frontális részét fedi. A kötőhártya alatt - nagyítóval látható - nyiroktüszők, valamint járulékos könnymirigyek fordulnak elő. A szemgolyó falát három hártya

adja, amelyen belül a szemgolyó magja, a szemcsarnokok, a szemlencse és az üvegtest foglalnak helyet (Szentágothai és Réthelyi, 1985).

I. A külső hártya: hátulsó 4/5-öd része a tülökhártya vagy *sclera*, elülső 1/5-öd része pedig a szaruhártya vagy *cornea*, mely elvékonyodó részét *limbus corneae*-nek nevezik. Bár a szaruhártyában nincsenek erek, ennek közelében a felső felületen koszorúszerű vénafonat a *plexus venosus sclerae* található.

II. A középső hártya a külsőnél vékonyabb, tükröződést gátló festékes kötőszöveti sejteket, idegi és simaizom elemeket, sűrű érhalózatot is tartalmazó hártya. A sclerára szorosan ráfekszik, a corneosclerális határon - tehát a külső hártya elülső és hátulsó részének találkozásánál - különválnak és a szemgolyó belseje felé fordul, ahol is a szivárványhártyát vagy *iris*-t alkotja. Ennek közepén tágulékony nyílás a pupilla helyeződik el. Tehát e középső hártyának három része van: a sclerára fekvő vékony *chorioidea*, a vastag *corpus ciliare* - ez foglalja magába a lencse függesztőkészülékét - és a fent említett iris.

III. A belső hártya, ami nem más, mint az ideghártya vagy *retina*.

A szemgolyó vérellátását tekintve három érrendszerre tagolható:

1. az ideghártyához térő retinális,
2. az érhártyát ellátó ciliaris,
3. az episcleralis - conjunctivalis érrendszer.

Ezen artériás érrendszerekhez természetesen egy hasonló struktúrájú vénás is tartozik. A kötőhártya vagy *tunica conjunctiva* kötőszövege ereiben bővelkedik, azonban ezek normálisan a sclera fehér felszíne ellenére alig látszanak.

Kisebb mechanikai, még inkább kémiai inger hatására vagy pedig gyulladásos állapotban az erek erősen kitágulnak, s így - az ember esetében a fehér alapon - jól láthatóak lesznek. (Fehér, 1989).

A szemre gyakorolt irritatív hatások bonyolultabb természete a szem összetett felépítéséből adódik. A lokális hatások mindenekelőtt a legkülső rétegen, a corneán okozhatnak enyhébb vagy súlyosabb irritációt. A cornea a test többi részén elhelyezkedő nyálkahártyához hasonló felépítésű egyrétegű laphám. Hámszöveti jellegénél fogva a corneát és conjunctivát károsító vegyületek hasonló mechanizmussal hatnak, mint a bőrirritatív anyagok, azonban már a viszonylag enyhe gyulladás is súlyosabb következményekkel jár. Ennek oka, hogy ha a szem külső rétegeinek fénytörése megváltozik, az a normális működést alapvetően gátolja. A corneában nem találhatók kapilláris erek, így az irritatív vegyületek okozta gyulladás az alatta található iris és érhártya gazdag érhálózatát érinti. A korrozív anyagok a szem mélyebb rétegeit is roncsolhatják (Kiss, 1997).

## 4. KÍSÉRLETI RÉSZ

### 4.1. Vizsgálati anyagok

#### 4.1.1. A vizsgálatokban alkalmazott koncentrációk

Az *in vitro* HET-CAM tesztben a vizsgálatba vont növényvédő szerek 1, 10 és 100%-os koncentrációját alkalmaztam. A növényvédő szer adalékanyagok esetében a 100%-os, a folyékony nitrogéntartalmú műtrágyák esetében pedig a 10 és 100%-os koncentrációkkal végeztem el az *in vitro* tesztet. A Draize-féle *in vivo* tesztben a vizsgálati leírásnak megfelelően a tömény (100%-os) koncentrációk vizsgálatát végeztem el. A növényvédő szer adalékanyagok az irodalmi adatok alapján erősen irritatívak a szemre. A kísérleti állatokat kímélve nem végeztem el a Draize-féle *in vivo* primer szemirritációs vizsgálatot ezen készítményekkel, hanem az irodalmi adatokat használtam fel.

Az *in vitro* tesztben alkalmazott emelkedő töménységű készítmények vizsgálatával próbáltam véleményt formálni arról, hogy a HET-CAM teszt alkalmas-e ugyanazon vegyi anyagok különböző koncentrációjához tartozó irritatív potenciáljának meghatározására.

#### 4.1.2 Herbicidek

##### **MODOWN 4 F (40% bifenox)**

A bifenox hatóanyag a halogénezett fenoléterek csoportjába tartozó difenil herbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

*Hatásmód és alkalmazás*

Szelektív herbicid. A lombozaton abszorbeálódik, megjelenik a hajtásokban, gyökérben. Fotoszintézis gátló, és sejtmembrán károsodást okoz. Gabonában, kukoricában, cirokban, szójában alkalmazzák kétszikű gyomok és néhány egyszikű ellen. (The Agrochemichals Handbook, 1991).

*Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon >6400 mg/ttkg, egéren 4556 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> nyúlön >20.000 mg/ttkg. Szemen és bőrön nem irritatív (The Agrochemichals Handbook, 1991).

##### **REGLONE (40% diquat-dibromid)**

Brómmal halogénezett bipiridil herbicid származék (Hunyadi és Béres, 2000).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Nem szelektív, kontakt herbicid, a lombozatban abszorbeálódik, xylénben transzlokálódik. A fotoszintézis alatt szuperoxid termelődik, amely a sejtmembránt és a citoplazmát károsítja. Betakarítás előtt deszikkálásra használják gyapot, lucerna, mák, szója, borsó, bab, napraforgó, kukorica, cukorrépa, burgonya és magtermő kultúrákban. Egynyári kétszikű gyomok ellen szőlőben, gyümölcsösben, zöldségben és mezőgazdaságilag nem művelt területeken alkalmazható (The Agrochemicals Handbook, 1991).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon 231 mg/ttkg, egéren 125 mg/ttkg, kutyán 100-200 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> nyúlra >750 mg/ttkg. Irritativ a bőrön és a szemben (The Agrochemicals Handbook, 1991).

## **DIKAMIN D ( 40% 2,4-D)**

A fenil gyökön halogént tartalmazó fenoxi-ecetsav herbicidek közé tartozik (Hunyadi, Béres, 2000).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Szelektív szisztémikus herbicid. A sói jól abszorbeálódnak a gyökéren, az észterek pedig a hajtásokon. Növekedés gátlóként fejtik ki

hatásukat. Posztemergens kétszikű gyomirtóként használható gabonafélékben, kukoricában, rizsben, fűfélékben, vízi kultúrákban és mezőgazdaságilag nem művelt területeken (Tomlin, 1994).

#### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon 639-764 mg/ttkg, egéren 138 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> patkányon > 1600 mg/ttkg, nyúlön >2400 mg/ttkg. Irritatív a bőrön és a szemén (Tomlin, 1994).

#### **RONSTAR (250 g/l oxadiazon)**

A heterociklusos oxadiazolonok csoportjába tartozó szerves herbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

#### *Hatásmód és alkalmazás*

Szelektív kontakt herbicid. Egy- és kétszikű gyomok ellen gyümölcsösben, szőlőben, gyapotban, rizsben, szójában, napraforgóban és hagymában használható (Tomlin, 1994).

### *Toxicitás emlősökön*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon > 5000 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> patkányon és nyúlra > 2000 mg/ttkg. Enyhén irritatív a szemre és bőrre (Tomlin, 1994).

### **FUSILADE S (12,5% fluazifop-P-butil)**

A fenoxi-fenoxi-propionátok csoportjába tartozó herbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Szelektív szisztémikus herbicid, a levelekben abszorbeálódik. A növényi sejtekben az ATP termelést befolyásolva fejti ki hatását. Vadzab, árva kelésű gabonák, egy éves és évelő egyszikűek irtására használható olajrepcében, cukorrépában, szójában, zöldségfélékben és gyümölcsösben (Tomlin, 1994).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> hím patkányon 3680 mg/ttkg, nőstény patkányon 2451 mg/ttkg, nyúlra 621 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> patkányon >2076 mg/ttkg, nyúlra >2400 mg/ttkg. Közepesen irritatív szemre és bőrre (Tomlin, 1994).

### **FLUBALEX (20% benfluralin)**

Az aromás aminok közé tartozó dinitro-anilin származék (Hunyadi és Béres, 2000).

#### *Hatásmód és alkalmazás*

Szelektív talaj herbicid, a gyökereken keresztül abszorbeálódik. Gátolja a csírázást, a gyökér és hajtás fejlődést. Egyéves egyszikűek és egyéves kétszikűek irtására használható salátában, uborkában, cikóriában, babban, lencsében, lucernában, herefélékben és dohányban (Tomlin, 1994).

#### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon > 10.000 mg/ttkg, egéren >5000 mg/ttkg, kutyán és nyúlon > 2000 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> nyúlon >5000 mg/ttkg. Nem irritatív a bőrre és a szemre (Tomlin, 1994).

### **REFINE DF (75% tifenszulfuron-metil)**

A szulfonilureák csoportjába tartozó mikroherbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Szelektív szisztémikus herbicid, az aminosavak szintézisének gátlásán keresztül gátolja a növekedést. A leveleken és a gyökéren abszorbeálódik. Fő felhasználási területe a gabonafélék, búza, árpa, kukorica, triticales posztemergens gyomirtása (Tomlin, 1994).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon >5000 mg/ttkg. Akut percután LD<sub>50</sub> nyúlra >2000 mg/ttkg. Nem irritatív bőrön, közepesen irritatív szemben (Tomlin, 1994).

### **TITUS 25 DF (25% rimszulfuron)**

A szulfonilureák csoportjába tartozó mikroherbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Szelektív, szisztémikus herbicid, a növény lombozatán és gyökéren keresztül szívódik fel, majd a merisztéma szöveteibe transzlokálódik. Az aminosavak szintézisének gátlásán keresztül megállítja a növény növekedését. Kukorica posztemergens gyomirtására alkalmazzák (Tomlin, 1994).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon >5000 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> nyúlön >2000 mg/ttkg. Nem irritatív bőrön, mérsékelten irritatív szemén (Tomlin, 1994).

### **ARELON 500 FW (500g/l izoproturon)**

Izopropil gyök szubsztituenst tartalmazó karbamid herbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Gabonafélékben, búza és árpa kultúrákban engedélyezett szisztémikus, posztemergens herbicid a magról kelő egy- és kétszikű gyomok ellen. A fotoszintézis elektrontranszportját gátló herbicid. Gyökéren és levélen keresztül szívódik fel (Tomlin, 1994).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut LD<sub>50</sub> patkányon 1826 és 5000 mg/ttkg között van, egéren 3350 mg/ttkg. Az akut perkután LD<sub>50</sub> >2000 mg/ttkg patkányon. Nem irritatív bőrön és szemén (Tomlin, 1994).

### **BANVEL 480 S (480g/l dikamba)**

Aromás karbonsav-származékok közé tartozó szerves herbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

#### *Hatásmód és alkalmazás*

Búza, árpa, kukorica, cirok és legelő kultúrában engedélyezett posztemergens, szelektív, szisztémikus herbicid a kétszikű gyomok ellen. Auxin hatású, elsősorban a nukleinsav- és fehérjeszintézisre hat. Gyökéren és levélen keresztül szívódik fel és gyorsan transzlokálódik a növényben (Tomlin, 1994).

#### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon 1707 mg/ttkg. Az akut perkután LD<sub>50</sub> nyúlra >2000 mg/ttkg. Erősen irritatív és korrozív szemre, mérsékelten irritatív bőrre (Tomlin, 1994).

### **MEDALLON (480 g/l glifozát-trimesium)**

A szervesfoszforsav-tartalmú herbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Gyümölcsös, szőlő kultúrákban használatos egy és kétszikű gyomok ellen. Engedélyezett még szántóföldi kultúra betakarítása után a tábla gyommentesítésére. Nem szelektív, szisztémikus herbicid, mely a lombozaton át gyorsan szívódik föl. Különböző enzimrendszerekre hat úgy, hogy befolyásolja az aminosavak és más fontos endogén vegyületek képződését (Tomlin, 1994).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> hím patkányon 748 mg/ttkg, nőstényen 755 mg/ttkg, egéren 1280 mg/ttkg. Az akut perkután LD<sub>50</sub> >2000 mg/ttkg nyúlón. Közepesen irritatív szemén és nem irritatív bőrön (Tomlin, 1994).

### **TELL 75 WG (75% primiszulfuron)**

A szulfonilureák csoportjába tartozó mikroherbicid (Hunyadi és Béres, 2000).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Kukoricában engedélyezett posztemergens gyomirtószer a kétszikű gyomok és a nehezen irtható egyszikűek ellen. Szelektív

szisztémikus herbicid, mely a gyökéren és lombozaton át szívódik föl, gyorsan transzlokálódik minden irányban. Hatására gátlódik az aminosavsintézis, a sejtosztódás s ezáltal megáll a növekedés (Tomlin, 1994).

#### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon >5050 mg/ttkg. Az akut perkután LD<sub>50</sub> >2010 mg/ttkg patkányon. Enyhén irritatív szemben, és nem irritatív bőrön (Tomlin, 1994).

### **4.1.3. Inszekticidek**

#### **SUMITHION 50 EC (50% fenitrothion)**

A szerves foszforvegyületek fenol-észter csoportjába tartozik. Olyan származék, amelynél az acilcsoport fenol vagy hidroxil csoportot tartalmazó heterociklikus vegyület (Almádi, C. és Nádasy, M., 1997).

#### *Hatásmód és alkalmazás*

Nem szisztémikus inszekticid, kontakt és gyomorméreg. Rágó-, szívó és szűrő száj szervű rovarok ellen alkalmazzák gabonában, kukoricában, gyümölcsösben, szőlőben, rizsben, szójában, cukorrépában,

zöldség kultúrákban, lucernában, dohányban. Felhasználják még közegészségügyi területeken rovarirtóként háztartási rovarok ellen (legyek, svábbogarak és más rovarok); állattenyésztésben, állatházakban legyek ellen, raktározott termékek kártevői ellen; moszkító lárvák és sáskák ellen (The Agrochemicals Handbook, 1991).

#### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon 570-800 mg/ttkg, egéren 870 mg/ttkg, tengerimalacon 500 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> hím patkányoknál 890 mg/ttkg, nőstény patkányoknál 1200 mg/ttkg, egereknél >3000 mg/kg (The Agrochemicals Handbook, 1991).

#### **SHERPA (250 g/l cipermetrin)**

A szintetikus piretroid inszekticidek közé tartozik (Almádi, C. és Nádasy, M., 1997).

#### *Hatásmód és alkalmazás*

Nem szisztémikus inszekticid, kontakt és gyomor méreg. Lepidopterák, coleopterák, dipterák, és hemipterák ellen gyümölcsösben, szőlőben, zöldségfélékben, kukoricában, szójában, rizsben, olajrepcében használható. Legyek és egyéb rovarkártevők ellen állatházakban, a

közegészségügy területén szúnyogok, legyek, csótányok ellen. Alkalmas az állati ektoparaziták elleni védekezésre (Tomlin, 1994).

#### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon 250-4150 mg/ttkg, egéren 138 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> patkányon > 4920 mg/ttkg, nyúlön >2460 mg/ttkg. Enyhén bőr és szemirritatív (Tomlin, 1994).

#### **4.1.4. Fungicidek, baktericidek**

##### **KARATHANE LC (350 g/l dinokap)**

A dinokap hatóanyag a dinitro-fenol szerves fungicidek jellegzetes képviselője (Almádi, C. és Nádasy, M., 1997).

#### *Hatásmód és alkalmazás*

Kontakt fungicid védő és gyógyító hatással, és nem szisztémikus akaricid. Lisztharmat ellen alkalmazzák gyümölcsösben, szőlőben, dísznövényeknél, néhány zöldségféléknél, dohányynál. Atkagyérítő hatású (The Agrochemicals Handbook, 1991).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> hím patkányon 980 mg/ttkg, nőstény patkányon 1190 mg/ttkg, kutyán 100 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> nyulaknál >4700 mg/ttkg. Bőr és szemirritatív. Szemen hályog képződhet (The Agrochemicals Handbook, 1991).

### **KOLFUGO 25 FW (25 % karbendazim)**

Az O-fenilén-diamin származékok benzimidazol csoportjába tartozik (Almádi, C. és Nádasy, M., 1997).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Szisztémikus fungicid védő és gyógyító hatással. Gyökéren és levélen át abszorbeálódik, akropetálisan szállítódik. Gabonában, gyümölcsösben (alma, csonthéjas, citrusfélék, banán, ananász, eper, ribizli), szőlőben, dísznövényeknél, cukorrépa, dohány, kávé, gyapot kultúrákban alkalmazzák (The Agrochemicals Handbook, 1991).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon >15.000 mg/ttkg, kutyán >2500 mg/ttkg. Akut i.p. LD<sub>50</sub> hím patkányon 7320 mg/ttkg, nőstény esetén 15.000 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> nyúlra >10.000 mg/ttkg, patkányon

>2000 mg/ttkg. Bőrre és szemre nem irritatív (The Agrochemicals Handbook, 1991).

### **NIMROD 25 EC (250 g/l bupirimát)**

A pirimidin-származékok közé tartozó szerves fungicid (Almádi, C. és Nádasy, M., 1997).

#### *Hatásmód és alkalmazás*

Szisztémikus fungicid védő és gyógyító hatással. A leveleken keresztül szívódik fel, és a xilemben transzlokálódik. Hatását a gomba sporulációjának gátlásán keresztül fejti ki. Lisztharmat ellen alkalmazzák dísznövény kultúrákban, valamint a szőlő-, gyümölcs- és zöldségtermesztésben (Tomlin, 1994).

#### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon, egéren és tengerimalacon > 4000 mg/ttkg. Akut percután LD<sub>50</sub> patkányokon 4800 mg/ttkg. Közepesen irritatív szemre és bőrön (Tomlin, 1994).

### **PUNCH 40 EC (40% fluzilazol)**

A fluzilazol a triazol típusú fungicidekhez sorolható vegyület (Almádi, C. és Nádasy, M., 1997).

#### *Hatásmód és alkalmazás*

Védő és gyógyító hatású szisztémikus fungicid. Az ergoszterol bioszintézisének gátlásával fejt ki a hatását. Széles hatásspektrumú, de leginkább lisztharmat, rozsda, és helminthospórium fajok ellen használják gyümölcs, gabonafélék, cukorrépa, napraforgó és zöldség kultúrákban (Tomlin, 1994).

#### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> hím patkányon 1100 mg/ttkg, nőstényen 674 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> nyúlön >2000 mg/kg. Közepesen irritatív szemén és bőrön (Tomlin, 1994).

### **KASUMIN 2L (2% kasugamicin)**

A kasugamicin hatóanyag a mezőgazdaságban alkalmazott antibiotikum. A *Streptomyces kasugaensis* tenyészetéből nyerhető (Almádi, C. és Nádasy, M., 1997).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Proteinszintézis gátló, szisztémikus fungicid és baktericid, védő és gyógyító hatással. A rizstermesztésben használható *Pyricularia oryzae* és más fitopatogén baktérium ellen. Alkalmazzák baktériumos betegségek ellen paprika, uborka, paradicsom, burgonya és gyümölcs kultúrákban (Tomlin, 1994).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> hím patkányon >5000 mg/ttkg. Akut perkután LD<sub>50</sub> nyúlön >2000 mg/ttkg. Nem irritatív szemén és bőrön (Tomlin, 1994).

### **4.1.5. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok**

A növényvédő szer hatóanyagokat – nagyon kevés kivételtől eltekintve – nem alkalmazzák tisztán, önmagukban, hanem különféle aktív és passzív segédanyagokkal keverve különböző szerekké formálják, majd ezeket a szereket hígítatlanul vagy hígítva célba juttatják. A formálás célja az, hogy valamely biológiailag aktív vegyület vagy adott esetben több vegyület keverékét a kívánt biológiai hatás kifejtésére alkalmassá tegyék (Almádi, C. és Nádasy, M., 1997).

## **XIOL**

### *Növényvédelmi célú alkalmazás*

Az emulzióképző folyékony permetező szerek (EC, E, LC, L formulációk) szerves oldószerként tartalmazhatnak xilolt.

### *Toxicitás emlősökre*

Erősen irritatív bőrön (Kertai, 1982).

## **TREND (izodecil-acetát)**

### *Növényvédelmi célú alkalmazás*

A diszpergálható granulátumok (DF, DG, WG formulációk) anionos nedvesítő szereik - amelyek sajátos biológiai aktivitással rendelkeznek -, mint technológiai adalékok a permetlé készítés során használatosak.

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon 2493 mg/ttkg. Dermális LD<sub>50</sub> érték nyúlra > 2020 mg/ttkg. Szemen irritatív, a bőrt nem izgatja (TREND Biztonságtechnikai adatlap).

#### 4.1.6. Folyékony műtrágyák

##### **NITROSOL 28 (28% nitrogén /100 l)**

A mezőgazdaságban talajerő visszapótlásra alkalmazott folyékony nitrogéntartalmú műtrágya (Ocskó, 1999).

##### *Hatásmód és alkalmazás*

Valamennyi szántóföldi és kertészeti kultúrában, szaktanácsadásnak megfelelő mennyiségben felhasználható alaptrágyaként, tavaszi kiegészítő és fejtrágyázásra (Ocskó, 1999).

##### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon >2000 mg/ttkg.

##### **KALCINOL (8,5% nitrogén /100 l)**

A mezőgazdaságban talajerő visszapótlásra alkalmazott folyékony nitrogéntartalmú műtrágya (Ocskó, 1999).

### *Hatásmód és alkalmazás*

Felhasználható elsősorban üvegházakban és fólia alatt termesztett növények, konténeres, hidrokultúra termesztésénél:

- tápoldatozásra az öntözővízzel 0,05-1,0%-os töménységben kijuttatva,
- levéltrágyázásra 0,1-1,0%-os töménységben, szaktanácsadás szerint (Ocskó, 1999).

### *Toxicitás emlősökre*

Akut orális LD<sub>50</sub> patkányon > 2000 mg/ttkg.

## **4.2. Kísérleti állatok**

### **4.2.1. A Shaver Starcross tojóhibrid**

A Shaver Starcross 288 tojóhibridet a kanadai Shaver cég tenyésztette ki (Bólyi Mezőgazdasági Kombinát, 1978). A világon ez az egyik legelterjedtebb tojóhibrid. Magyarországon forgalmazója a Bólyi Mezőgazdasági Kombinát.

Mivel Leghorn típusú, ebből adódóan tollazatának színe fehér, tojásai mézsfehér színűek. Élénk vérmérsékletű, ijedős állat. Takarmányértékesítő képessége jó (Miklósné, 1991).

Shaver Starcross 288 tojóhibrid tojásokat ajánl az alkalmazott vizsgálati módszer leírás, mivel ezen hibrid tojásainak kelési aránya igen magas (90% vagy magasabb) és örökletes fejlődési rendellenességektől mentes ez a törzs.

#### **4.2.2. Az új-zélandi fehér nyúl**

Labor nyúlként állatkísérletekben elsősorban a kisebb testtömegű (2 kg alatti) holland törzset, és a nagyobb testtömegű (2-5 kg között) új-zélandi fehér nyulat használják. A kutatási területek közül a teratológiai vizsgálatokban, antiszérum előállításra, szem- és bőrirritációs vizsgálatokban, és az atherosclerosis vizsgálatokban alkalmaznak laboratóriumi nyulat tesztorganizmusként (Havenaar és mtsai, 1993).

Az új-zélandi fehér nyúl középnagy testű fajta, szőrzete hófehér, szeme piros, körmei világos szaruszínűek. Kifejlettkori testtömege 4,5-5,5 kg. A testformák (hengeres) jól tükrözik a hústermelésre jellemző típust. A fej könnyű, a törzs rövid és széles, a hát és a far különösen jól izmolt. Gyorsan fejlődik, a jó takarmányokat kiválóan hasznosítja, 8 hetes korára eléri az 1,8-2,00 kg-ot (Holdas, 1976).

### **4.3. Vizsgálati módszerek**

#### **4.3.1. A HET-CAM teszt**

Vizsgálataimat az Invitox Protocol 47. száma (1990) alapján végeztem el. A módszer alapja, hogy a vegyi anyagokat (növényvédő szereket és azok egyes komponenseit, műtrágyákat) közvetlenül a 10 napig keltetett embrionálódott tyúktojás chorioallantois membránjára helyeztem. A kezelés hatására fellépő érkárosodások utalnak a vegyszerek nedves membrán károsító hatására.

##### **4.3.1.1. Felszerelések, eszközök, laborvegyszerek**

*Felszerelések, eszközök:*

- inkubátor: optimális hőmérséklet  $37,5^{\circ}\text{C}$  (+ - 0,5), relatív páratartalom 62,5 % (+ - 7,5%),
- tojásátvilágító lámpa,
- egyenes csipesz,
- szemész olló,
- pipetták, szemcseppentők,
- stopperóra,
- számítógép megfelelő értékelő programmal.

*Laborvegyszerek:*

- 0,9%-os NaCl,
- 1%-os SDS (Na-lauril szulfát),
- 0,1 M NaOH.

#### **4.3.1.2. A vizsgálat kivitelezése**

A vizsgálathoz White Leghorn (Shaver Starcross 288) tyúktojásokat alkalmaztam. A tojásokat a vizsgálat elvégzése előtt lámpáztam, és a hibásakat eltávolítottam. A tojásokat 37,5 °C-on, 60-70 %-os relatív páratartalom mellett inkubátorban keltettem.

Nyolc napon át, napi gyakorisággal forgattam a tojásokat, hogy elkerüljem az embrió letapadását. A 9. napon átvilágítottam a tojásokat, és az életképteleneket eltávolítottam. A tojásokat most már tompa végükkel felfelé raktam vissza az inkubátorba, ezzel biztosítottam a CAM hozzáférhetőségét. A kezeléseket és azok értékelését a keltetés 10. napján végeztem el.

Az előkészítés során elkészítettem a szükséges laborvegyszerek előírt töménységét, és a mezőgazdasági vegyi anyagok megfelelő koncentrációjú szuszpenzióját, oldószerként desztillált vizet használtam. Az oldatokat és a szuszpenziókat a vizsgálatok előtt mindig frissen készítettem el.

A tojások kezelésre történő előkészítésénél megjelöltem a légkamra elhelyezkedését, majd a megjelölt tojáshéjrészt olló és csipesz segítségével óvatosan eltávolítottam.

A belső membránt 0,9%-os NaCl oldattal nedvesítettem meg, majd a tojásokat visszaraktam a tálcára (maximum 30 perc telhet el a tojás felnyitása és a kezelés között).

A kezelés előtt a héjmembránt fogász csipesszel óvatosan eltávolítottam, így a CAM alkalmassá vált a kezelésre. A kezelést minden koncentrációban 4 ismétlésben végeztem el a következők szerint:

- standard: 2 tojás 1 %-os SDS-al és 0,1 M NaOH-al kezelve,
- kontroll: 2 tojás 0,9 %-os NaCl-al kezelve,
- vizsgálati anyag: 6 tojás koncentrációnként kezelve.

A kezeléskor a chorioallantois membránra 0,3 ml tesztanyagot cseppentettem, és a kezeléstől számított 5 percig figyeltem meg a membránt és kialakuló reakciókat.

#### **4.3.1.3. A tojások feldolgozása**

##### **4.3.1.3.1. Makroszkópos vizsgálatok**

A 10 napos embrionálódott tyúktojás chorioallantois membránján a vizsgálati anyagokkal történt kezelést követően a következő elváltozások figyelhetők meg:

- vérzés,
- véredény lízis,
- koaguláció.

A CAM-on jelentkező elváltozásokat, és az elváltozások megjelenésének időpontjait - másodpercekben - jegyzőkönyvben rögzítettem.

Az adatok feldolgozása egy speciális számítógépes program segítségével történt. Az értékelést a számítógép a következő algoritmus alapján végezte el (Invittox Protocol 47, 1990).

$$RI = \frac{301 - ST_{\text{sekHE}}}{300} \times 5 + \frac{301 - ST_{\text{sekVL}}}{300} \times 7 + \frac{301 - ST_{\text{sekCO}}}{300} \times 9$$

HE: vérzés

VL: érlízis

CO: koaguláció

RI: irritációs index

STsek: indulási idő, másodpercben.

#### **4.3.1.3.2. Szövettani vizsgálatok**

##### **4.3.1.3.2.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok**

A fénymikroszkópos értékeléshez a kezelés helyéről kimetszett CAM szervdarabokat 4%-os formaldehid oldatban fixáltam. A paraffinos beágyazást (Shandon Citadell 200 automata) követően a Reichert szánkás mikrotómmal elkészített metszeteket hematoxin-eozinnal és rezorcin-fukszinnal festettem meg (Krutsay, 1980).

A fénymikroszkópos vizsgálatok elvégzéséhez erősen irritatív vizsgálati anyagokat használtam fel, növényvédő szerek közül a FUSILADE S herbicid, a KARATHANE LC fungicid, növényvédő szer segédanyagok közül a TREND anionos nedvesítő szer került bevonásra.

#### **4.3.1.3.2.2. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok**

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a kezelés helyéről kimetszett CAM szervdarabokat először 5%-os glutáraldehid, majd 2%-os ozmium-tetraoxidban rögzítettem (Karnovsky, 1965). A mintákat felszálló alkohol sorozatban víztelenítettem, Durcupanba (ACM Fluka) ágyaztam be. A fél- és ultravékony metszeteket Reichert ultramikrotómmal készítettem. A félvékony metszeteket toluidinkékkel festettem meg. Az elektronmikroszkópos felvételeket Tesla BS 613 készülékkel végeztem el.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzéséhez erősen irritatív vizsgálati anyagokat alkalmaztam, növényvédő szerek közül a FUSILADE S herbicid, a KARATHANE LC fungicid, növényvédő szer segédanyagok közül a TREND anionos nedvesítő szert használtam fel.

#### **4.3.2. Draize-féle szemirritációs vizsgálat nyúlón**

##### **4.3.2.1. Felszerelések, eszközök**

- szemcseppentő,
- főzőpohár.

#### **4.3.2.2. A vizsgálat kivitelezése**

A vizsgálathoz kísérleti állatként az új zélandi fehér nyulat használtam. A vizsgálatokat Draize és mtsai (1944) által leírt módszer alapján végeztem el. Az állatokat klimatizált állatszubában, egyedi ketrecekben tartottam. A vizsgálat idejére 22-25<sup>0</sup>C-ot és 50-70%-os relatív páratartalmat biztosítottam. Takarmányként egységes nyúltápot, ivóvízként csapvizet kaptak ad libitum.

Vizsgálatonként 3 nyulat kezeltem, kontrollként a kezeletlen, ellenoldali szem szolgált (önkontrollos teszt). Az egyik - jobb - oldali szem kötőhártyaszákjába 0,1 ml vizsgálati anyagot helyeztem állatonként. A vizsgálati anyagok szuszpenzióit, illetve emulzióit mindig a vizsgálatok előtt készítettem el.

#### **4.3.2.3. A nyúlszem feldolgozása**

##### **4.3.2.3.1. Makroszkópos vizsgálatok**

A szem elváltozásait a kezelést követő 1., 24. óra, 2., 3., 4., 7. és 14. nap után értékeltem. A teszt önkontrollos, ezért nem volt szükség külön kontroll csoport beállítására. A vizsgálati eredményeket táblázatban rögzítettem. Az értékelés alapjául a Draize-féle szemirritációs módszer pontozási rendszere szolgált (1.táblázat).

## 1.táblázat Draize-féle értékelő pontozás

| <b>I. Kötőhártya</b>                                      | <b>Pont</b>   |
|-----------------------------------------------------------|---------------|
| <i>A. Vérbőrség</i>                                       |               |
| Az erek a normálist meghaladóan, határozottabban láthatók | 1             |
| Kifejezettebb, sötétebb, karmazsinvörös szín              | 2             |
| Diffúz, sötétvörös szín                                   | 3             |
| <i>B. Duzzadás</i>                                        |               |
| Enyhe duzzadás, beleértve a pislogóhártyát is             | 1             |
| Szemhéjak részleges kifordulásával                        | 2             |
| Félig zárt, duzzadt szemhéjak                             | 3             |
| Teljesen zárt, duzzadt szemhéjak                          | 4             |
| <i>C. Váladékképződés</i>                                 |               |
| Normálist meghaladó mennyiség                             | 1             |
| A szemhéjak széle nedves                                  | 2             |
| A szemhéjak környéke is nedves                            | 3             |
| Értékelés: ( A + B + C ) x 2                              | Max.: 20 pont |

## II. Szaruhártya

|                                                                                       |   |
|---------------------------------------------------------------------------------------|---|
| <i>A. Homály mértéke</i>                                                              |   |
| Elszórt, diffúz homály, a szivárványhártya világosan látható                          | 1 |
| A homályban átlátszó területek, a szivárványhártya részletei csak homályosan láthatók | 2 |
| Opálos homály, a szivárványhártya részletei nem láthatók                              | 3 |
| Intenzív opálos, a szivárványhártya láthatatlan                                       | 4 |

B. *A homály területe*

|                                            |   |
|--------------------------------------------|---|
| 1/4 rész vagy kisebb                       | 1 |
| 2/4 résznél kisebb, de 1/4 résznél nagyobb | 2 |
| 3/4 résznél kisebb, de 1/2 résznél nagyobb | 3 |
| Teljes felszín, 3/4 résznél nagyobb        | 4 |

Értékelés: A x B x 5

Max.: 80 pont

**III. Szivárványhártya**

A. *Elváltozások*

|                                                                                    |   |
|------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Vérbő, redőzöttebb írisz, szaruhártya belövellt, az írisz fényre még enyhén reagál | 1 |
| Vérzés, fényre nem reagál                                                          | 2 |

Értékelés: A x 5

Max.: 10 pont

Végső pontszám: I + II + III = 20 + 80 + 10 = 110 pont

**4.4. Statisztikai vizsgálatok**

Az *in vitro* HET-CAM tesztből és a Draize-féle *in vivo* tesztből származó eredmények statisztikai összehasonlításánál a Pearson-féle korrelációs vizsgálatot végeztem el (Pearson, 1901). A korrelációs

együttható megbízhatóságának ellenőrzésére Student-féle  $t$  próbát alkalmaztam (Finney, 1972).

Az *in vitro* és *in vivo* tesztekől származó eredményekkel elvégeztem a kétváltozós lineáris regresszió analízist a kapcsolat törvényszerűségeinek feltárása érdekében (Sváb, 1973).

## **5. EREDMÉNYEK, ÉRTÉKELÉS**

### **5.1. A HET-CAM tesztből származó eredmények**

#### **5.1.1. Makroszkópos eredmények**

##### **5.1.1.1. Herbicidek makroszkópos eredményei**

A MODOWN 4 F herbicid 1%-os emulziójával történt kezelést követően a CAM-on lízis jelentkezett a megfigyelési idő 148-262. másodperce között. A 10%-os emulzióval történt kezelés hatására a megfigyelési idő 160-286. másodperce között lízis, és egy tojás esetében a 169. másodpercben vérzés alakult ki. A MODOWN 4 F herbicid 100%-os koncentrációjú emulziójával elvégzett kezelés értékelését nem tudtam elvégezni, mivel a herbicid készítmény töményen átlátszatlan és a membránt elfedte.

A REGLONE herbicid 1%-os emulziójával történt kezelés eredményeként a CAM-on lízis alakult ki a megfigyelési idő 30-130. másodperce között, és a megfigyelési idő 10-185. másodperce között pedig vérzés volt megfigyelhető. A 10%-os koncentrációval történt kezelést követően lízis jelentkezett a megfigyelési idő 29-129. másodperce között, valamint vérzés a kezelés utáni 59-267. másodperc között. A REGLONE herbicid tömény emulziója színes átlátszatlan

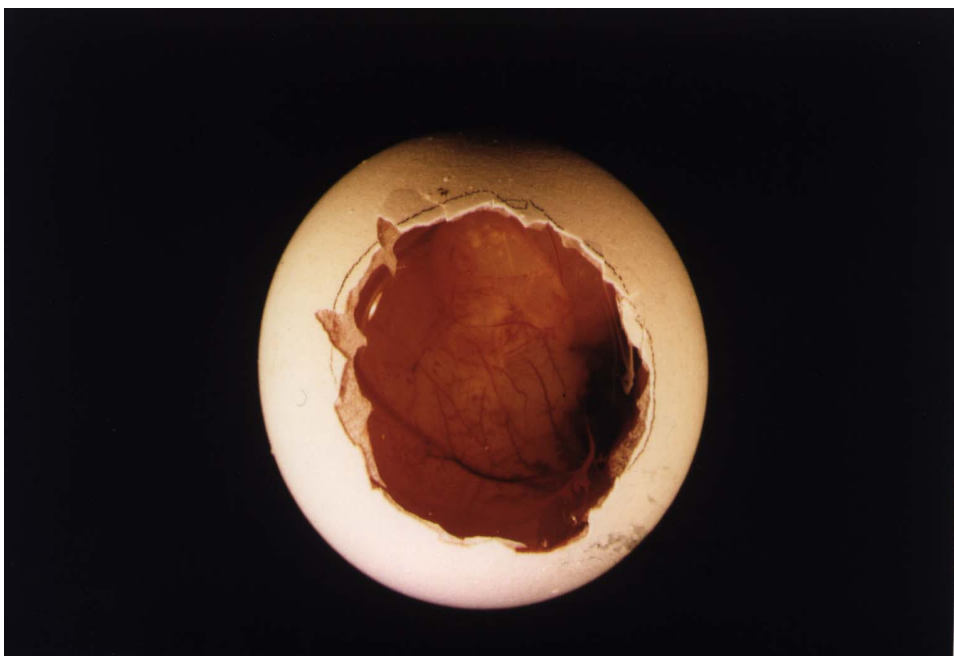
folyadék, ami a kezelést követően elfedte a membránt és megakadályozta az elváltozások értékelését.

A DIKAMIN D herbicid 1%-os koncentrációjú emulziójával végzett kezelést követően a CAM-on lízis jelentkezett a megfigyelési idő 72-188. másodperce között, majd pedig vérzés alakult ki a megfigyelési idő 78-268. másodperce között. A 10%-os koncentrációjú herbiciddel történt kezelés hatására egy tojás esetében lízis alakult ki a megfigyelési idő 29. másodpercében, a vérzések pedig a megfigyelési idő 21-41. másodperce között jelentek meg. A DIKAMIN D herbicid 100%-os koncentrációja a megfigyelési idő 11-26. másodperce között lízist okozott a CAM-on, a vérerek vérzése a megfigyelési idő 12-59. másodperce között jelentkezett.

A CAM-on a RONSTAR herbicid 1%-os emulziójával végzett kezelést követően lízis alakult ki a megfigyelési idő 45-80. másodperce között, a vérzések a megfigyelési idő 75-260. másodperce között jelentek meg. A 10%-os herbiciddel végzett kezelés hatására vérzés jelentkezett a megfigyelési idő 47-105. másodperce között. A RONSTAR herbicid 100%-os emulziójával történt kezelés eredményeként lízis alakult ki a megfigyelési idő 25-38. másodperce között a CAM-on, a vérzések megjelenése a megfigyelési idő 20-80. másodperce között volt.

A FUSILADE S herbicid 1%-os emulziójával elvégzett kezelés hatására vérzés alakult ki a CAM-on a megfigyelési idő 48-107. másodperce között. A herbicid 10%-os koncentrációjú emulziójával

történt kezelést követően lízis jelentkezett a megfigyelési idő 19-36. másodperce között, a vérzések kialakulása a megfigyelési idő 32-56. másodperce között volt. A FUSILADE S herbicid 100%-os emulziójával végzett kezelés eredményeként a megfigyelési idő 16-28. másodperce között lízis alakult ki, majd a 25-49. másodperc között vérzések jelentek meg a CAM-on (5. ábra).



**5. ábra FUSILADE S herbicid 100%-os emulziójával kezelt CAM-on kialakult vérzés a megfigyelési idő 45. másodpercében**

A FLUBALEX herbicid 1%-os emulziójával elvégzett kezelést követően a megfigyelési idő 75-114. másodperce között vérzés jelentkezett a CAM-on. A herbicid 10%-os emulziójával történt kezelés hatására vérzés alakult ki a megfigyelési idő 49-102. másodperce között. A FLUBALEX herbicid 100%-os koncentrációjú emulziójával végzett kezelés vérzés kialakulását eredményezte a CAM-on a megfigyelési idő 35-105. másodperce között.

A REFINE DF herbicid 1%-os szuszpenziója a CAM felületén nem okozott látható elváltozást a 300 másodperces megfigyelési idő alatt. Nagyobb koncentrációjú, 10%-os szuszpenziója, a megfigyelési idő 155-169. másodpercében vérzést eredményezett a CAM-on. A 100%-os töménységű készítmény vizsgálatát nem tudtam elvégezni, mivel ilyen töménységben nem tudtam vízben oldani a REFINE 75 DF herbicidet.

A CAM-on a TITUS 25 DF herbiciddel végzett kezelést követően az 1%-os szuszpenzió esetében az 5 perces megfigyelési idő alatt a membrán felületén vérzés vagy lízis nem jelentkezett. A 10%-os koncentrációjú szuszpenzió vizsgálatakor a megfigyelési idő 62-91. másodpercében vérzés volt látható a CAM-on. A 100%-os töménységű szuszpenzió károsító hatása az oldhatósági problémák miatt nem volt vizsgálható.

Az ARELON 500 FW herbicid 1%-os emulziójával történt kezelést követően lízis alakult ki a CAM-on a megfigyelési idő 100-140. másodperce között, a vérzések a megfigyelési idő 115-154. másodperce

között jelentek meg. A herbicid 10%-os emulziójával elvégzett kezelés hatására lízis volt megfigyelhető a megfigyelési idő 57-150. másodperce között, a vérzések megjelenése a megfigyelési idő 65-137. másodperce között volt. Az ARELON 500 FW herbicid 100%-os koncentrációjú emulziójával végzett kezelés eredményeként lízis alakult ki a CAM-on a megfigyelési idő 10-43. másodperce között, a vérzések a megfigyelési idő 25-43. másodperce között jelentkeztek.

A BANVEL 480 S herbicid 1%-os emulziójával elvégzett kezelés hatására vérzés alakult ki a megfigyelési idő 30-136. másodperce között a CAM-on. A herbicid 10%-os koncentrációjú emulziójával történt kezelés hatására lízis jelentkezett a CAM-on a megfigyelési idő 23-91. másodperce között, a vérzések a megfigyelési idő 58-72. másodperce között jelentek meg. A BANVEL 480 S herbicid 100%-os emulziójával végzett kezelést követően lízis alakult ki a megfigyelési idő 7-18. másodperce között a CAM-on, a vérzések megjelenése a megfigyelési idő 28-64. másodperce között volt.

A MEDALLON herbicid 1%-os koncentrációjú emulziójával elvégzett kezelést követően a 300 másodperces megfigyelési idő alatt a CAM vérérrendszerében károsodás nem alakult ki. A herbicid 10%-os emulziójával történt kezelés hatására vérzés jelentkezett a megfigyelési idő 170-290. másodperce között a CAM-on. A MEDALLON herbicid 100%-os koncentrációjú emulziójával végzett kezelés eredményeként vérzés volt megfigyelhető a CAM-on a megfigyelési idő 170-215. másodperce között.

A TELL 75 WG herbicid 1%-os szuszpenziójával végzett kezelést követően elváltozás nem jelentkezett a CAM vérrendszerében a 300 másodperces megfigyelési idő alatt. A herbicid 10%-os szuszpenziójával történt kezelés hatására a CAM-on károsodások nem alakultak ki az 5 perces megfigyelési idő alatt. A TELL 75 WG herbicid tömény szuszpenziójával elvégzett kezelés eredményeként vérzés alakult ki a CAM-on a megfigyelési idő 240-280. másodperce között.

#### **5.1.1.2. Inszekticidek makroszkópos eredményei**

A SUMITHION 50 EC inszekticid 1%-os emulziójával elvégzett kezelést követően lízis alakult ki a CAM-on a megfigyelési idő 65-200. másodperce között, a vérzések a megfigyelési idő másodperce 145-195. között jelentek meg. Az inszekticid 10%-os emulziójával végzett kezelés eredményeként lízis alakult ki a megfigyelési idő 40-145. másodperce között a CAM-on, a vérzések a megfigyelési idő 80-225. másodperce között jelentkeztek. A SUMITHION 50 EC inszekticid 100%-os emulziójával végzett kezelés hatására lízis jelentkezett a megfigyelési idő 20-55. másodperce között, a vérzések a megfigyelési idő 45-140. másodperce között jelentek meg.

A SHERPA inszekticid 1%-os emulziójával elvégzett kezelést követően vérzés jelentkezett a CAM-on a megfigyelési idő 28-95. másodperce között. Az inszekticid 10%-os emulziójával történt kezelés hatására vérzések alakultak ki a CAM-on a megfigyelési idő 24-65. másodperce között. A SHERPA inszekticid tömény emulziójával végzett

kezelés eredményeként lízis alakult ki a megfigyelési idő 18-24. másodperce között a CAM-on, a vérzések a megfigyelési idő 25-50. másodperce között jelentek meg.

#### **5.1.1.3. Fungicidek, baktericidek makroszkópos eredményei**

A KARATHANE LC fungicid 1%-os emulziójával elvégzett kezelést követően lízis alakult ki a CAM-on a megfigyelési idő 46-283. másodperce között. A 10%-os fungiciddal végzett kezelés hatására lízis jelentkezett a CAM-on a megfigyelési idő 59-108. másodperce között. A KARATHANE LC fungicid 100%-os koncentrációjú emulziójával elvégzett kezelés értékelését nem tudtam elvégezni, mivel a herbicid készítmény töményen színes, átlátszatlan és a membránt elfedte.

A KOLFUGO 25 FW fungicid 1%-os emulziójával elvégzett kezelés hatására lízis alakult ki a CAM-on a megfigyelési idő 83-227. másodperce között. A fungicid 10%-os emulziójával történt kezelést követően lízis jelentkezett a CAM-on a megfigyelési idő 116-288. másodperce között. A KOLFUGO 25 FW fungicid tömény emulziója fehér színű átlátszatlan folyadék, amely a kezelést követően elfedte a CAM-ot és akadályozta az elváltozások kiértékelését.

A NIMRÓD 25 EC fungicid 1%-os koncentrációjának vizsgálatakor a kezelést követő 182-226. másodpercben, a 10%-os emulzió esetén pedig a megfigyelési idő 48-83. másodperce között jelentkezett vérzés a CAM felületén. A NIMRÓD 25 EC fungicid 100%-

os emulziójával elvégzett kezelés hatására a megfigyelési idő 19-36. másodpercében vérzés jelentkezett a CAM-on.

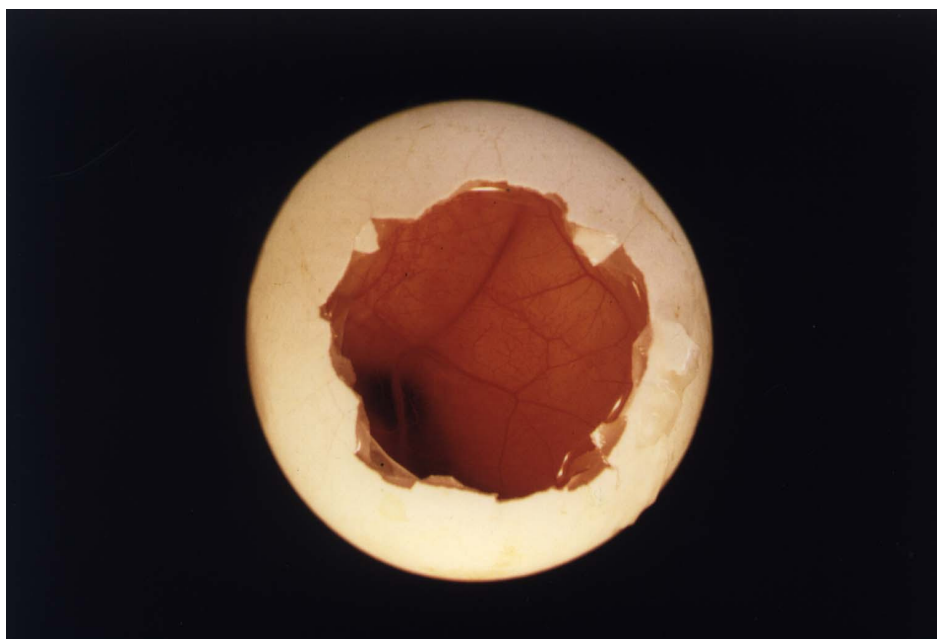
A PUNCH 40 EC fungicid készítmény 1%-os emulziója a megfigyelési idő 114-117. másodpercében vérzést idézett elő a membrán felszínén. A megfigyelési idő 58-60. másodpercében vérzést okozott a készítmény 10%-os emulziója. A PUNCH 40 EC fungicid 100%-os emulziójával elvégzett kezelés hatására a megfigyelési idő 14. másodpercében lízis, és a 29-30. másodpercében vérzés volt megfigyelhető a CAM-on.

A KASUMIN 2L baktericid 1%-os emulziója a kezelést követő 234-251. másodperc között vérzést idézett elő a CAM-on. A 10%-os töménység vizsgálata során a 97-104. másodpercben vérzés jelentkezett a CAM-on. A baktericid 100%-os emulziójával történt kezelés eredményeként a megfigyelési idő 66-82. másodpercében vérzés volt megfigyelhető a CAM felületén.

#### **5.1.1.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok makroszkópos eredményei**

A XILOL 100%-os koncentrációjú oldatával elvégzett kezelést követően a megfigyelési idő 42-49. másodperce között lízis, a megfigyelési idő 93-105. másodperce között pedig vérzés volt látható a CAM-on.

A TREND 100%-os készítménye a kezelést követően a megfigyelési idő 34-39. másodperce között lízist idézett elő, a megfigyelési idő 104-137. másodperce között pedig vérzés alakult ki a CAM-on (6. ábra).



**6.ábra TREND növényvédő szer segédanyag 100%-os koncentrációjú készítményével kezelt CAM-on kialakult vérzés a megfigyelési idő 115. másodpercében**

#### **5.1.1.5. Folyékony műtrágyák makroszkópos eredményei**

A NITROSOL 28 10%-os emulziójának hatására lízis alakult ki a CAM-on a megfigyelési idő 35-55. másodperce között. A NITROSOL 28

100%-os készítményével végzett kezelés eredményeként lízis jelentkezett a megfigyelési idő 12-20. másodperce között, majd pedig a megfigyelési idő 240. másodpercétől vérzések jelentek meg.

A KALCINOL 10%-os emulziójával történt kezelést követően lízis jelentkezett a CAM-on a megfigyelési idő 80-120. másodperce között. A tömény készítménnyel elvégzett kezelés eredményeként a megfigyelési idő 25-50. másodperce között lízis alakult ki a CAM-on.

#### **5.1.2. A makroszkópos eredmények értékelése**

A makroszkópos eredmények értékelését a Vizsgálati módszer alfejezetben (3.3.1.3.1.) leírt kiértékelő algoritmus segítségével végeztem el. A vizsgálati anyagokkal történt kezeléseket követően a megfigyelési idő alatt a CAM-on észlelt elváltozásokat és azok megjelenési idejét rögzítve a számítógépes program felhasználásával irritációs indexeket képeztem. A vizsgálati anyagok különböző koncentrációjú kezeléseinek hatásaihoz számított irritációs indexeket beillesztettem a kiértékelő táblázatba (2. táblázat) és meghatároztam az illető vegyi anyag irritációs potenciálját.

**2. táblázat A HET-CAM teszt kiértékelő irritációs indexei és potenciálja**

| <b>Irritációs index</b> | <b>Irritációs potenciál</b>             |
|-------------------------|-----------------------------------------|
| <b>0-0,9</b>            | <b>nem irritatív</b>                    |
| <b>1-4,9</b>            | <b>gyengén irritatív</b>                |
| <b>5-8,9</b>            | <b>mérsékelten, közepesen irritatív</b> |
| <b>9-21</b>             | <b>erősen irritatív</b>                 |

**5.1.2.1. Herbicidek makroszkópos eredményeinek értékelése**

A herbicidek hatására a tyúktojás chorioallantois membránján kialakult károsodásokhoz a számítógépes program alapján hozzárendelt irritációs indexeket a 3. táblázatban foglaltam össze.

**3. táblázat A herbicidek irritációs indexei**

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>Irritációs indexek</b> |            |             |
|---------------------------|---------------------------|------------|-------------|
| <b>Koncentráció</b>       | <b>1%</b>                 | <b>10%</b> | <b>100%</b> |
| <b>MODOWN 4 F</b>         | <b>2,2</b>                | <b>1,9</b> | <b>-*</b>   |
| <b>REGLONE</b>            | <b>5,3</b>                | <b>6,7</b> | <b>-*</b>   |
| <b>DIKAMIN D</b>          | <b>3,6</b>                | <b>4,6</b> | <b>9,1</b>  |
| <b>RONSTAR</b>            | <b>4,9</b>                | <b>3,9</b> | <b>5,3</b>  |
| <b>FUSILADE S</b>         | <b>3,8</b>                | <b>5,1</b> | <b>9,0</b>  |
| <b>FLUBALEX</b>           | <b>3,4</b>                | <b>3,9</b> | <b>4,1</b>  |

| <b>Vizsgálati anyagok</b>                       | <b>Irritációs indexek</b> |            |             |
|-------------------------------------------------|---------------------------|------------|-------------|
| <b>Koncentráció</b>                             | <b>1%</b>                 | <b>10%</b> | <b>100%</b> |
| <b>REFINE DF</b>                                | <b>0,0</b>                | <b>2,2</b> | <b>-*</b>   |
| <b>TITUS 25 DF</b>                              | <b>0,0</b>                | <b>3,7</b> | <b>-*</b>   |
| <b>ARELON 500 FW</b>                            | <b>3,4</b>                | <b>4,2</b> | <b>5,7</b>  |
| <b>BANVEL 480 S</b>                             | <b>3,1</b>                | <b>5,8</b> | <b>11,1</b> |
| <b>MEDALLON</b>                                 | <b>0,0</b>                | <b>1,5</b> | <b>2,0</b>  |
| <b>TELL</b>                                     | <b>0,0</b>                | <b>0,0</b> | <b>0,7</b>  |
| <b>NAOH 0,1 M+SDS 1%<br/>(pozitív kontroll)</b> | <b>11,5</b>               | <b>-</b>   | <b>-</b>    |

\* A 100%-os töménységhez tartozó irritációs indexek meghatározása nem volt elvégezhető, mert a tömény színes készítmények elfedték a membránt és így akadályozták az elváltozások kiértékelését. A szilárd készítmények esetében oldhatósági problémák miatt nem szerepelnek a 100%-os töménységhez tartozó irritációs indexek.

A számítógépes program segítségével kapott irritációs indexeket beillesztve a 2. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A MODOWN 4 F herbicid 1 és 10%-os emulziója az irritációs indexek alapján gyengén irritatív.

A REGLONE gyomirtó szer 1 és 10%-os emulziója az irritációs indexek alapján közepesen irritatív.

A DIKAMIN D herbicid 1 és 10%-os emulziója gyengén, a 100%-os készítmény erősen irritatív az irritációs indexek alapján.

A RONSTAR herbicid 1 és 10%-os emulziója az irritációs indexek alapján gyengén, a 100%-os emulziója közepesen irritatív.

A FUSILADE S gyomirtó szer 1%-os emulziója gyengén, 10%-os szuszpenziója közepesen, 100%-os emulziója erősen irritatív az irritációs indexek alapján.

A FLUBALEX herbicid 1, 10 és 100%-os emulziója az irritációs indexek alapján gyengén irritatív.

A REFINE DF herbicid 1%-os szuszpenziója nem, 10%-os szuszpenziója gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

A TITUS 25 DF herbicid 1%-os szuszpenziója az irritációs indexek alapján nem, a 10%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

Az ARELON 500 FW herbicid 1 és 10%-os emulziója gyengén, a 100%-os emulziója közepesen irritatív az irritációs indexek alapján.

A BANVEL 480 S herbicid 1%-os emulziója az irritációs indexek alapján gyengén, 10%-os emulziója közepesen, 100%-os emulziója erősen irritatív.

A MEDALLON gyomirtó szer 1%-os emulziója nem, 10 és 100%-os emulziója gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

A TELL 75 WG herbicid egyetlen kísérleti koncentrációban sem bizonyult irritatívnak az irritációs indexek alapján.

A pozitív kontrollként alkalmazott 0,1 M-os NaOH és 1%-os SDS oldatok erősen irritatívak az irritációs indexek alapján.

#### **5.1.2.2. Inszekticidek makroszkópos eredményeinek értékelése**

Az inszekticidek hatására a tyúktojás chorioallantois membránján kialakult károsodásokhoz a számítógépes program alapján hozzárendelt irritációs indexeket a 4. táblázatban foglaltam össze.

#### 4. táblázat Az inszekticidek irritációs indexei

| Vizsgálati anyagok                      | Irritációs indexek |     |      |
|-----------------------------------------|--------------------|-----|------|
|                                         | 1%                 | 10% | 100% |
| SUMITHION 50 EC                         | 4,3                | 5,3 | 6,9  |
| SHERPA                                  | 4,0                | 4,9 | 6,9  |
| NAOH 0,1 M+SDS 1%<br>(pozitív kontroll) | 11,5               | -   | -    |

A számítógépes program segítségével kapott irritációs indexeket beillesztve a 2. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A SUMITHION 50 EC inszekticid 1%-os emulziója az irritációs indexek alapján gyengén, 10 és 100%-os emulziója közepesen irritatív.

A SHERPA inszekticid 1 és 10%-os emulziója gyengén, 100%-os emulziója közepesen irritatív az irritációs indexek alapján.

A pozitív kontrollként alkalmazott 0,1 M-os NaOH és 1%-os SDS oldatok erősen irritatívak az irritációs indexek alapján.

##### 5.1.2.3. Fungicidek, baktericidek makroszkópos eredményeinek értékelése

A fungicidek, baktericidek hatására a tyúktojás chorioallantois membránján kialakult károsodásokhoz a számítógépes program alapján hozzárendelt irritációs indexeket a 5. táblázatban foglaltam össze.

**5. táblázat Fungicidek, baktericidek irritációs indexei**

| <b>Vizsgálati anyagok</b>                       | <b>Irritációs indexek</b> |            |             |
|-------------------------------------------------|---------------------------|------------|-------------|
|                                                 | <b>1%</b>                 | <b>10%</b> | <b>100%</b> |
| <b>KARATHANE LC</b>                             | <b>4,6</b>                | <b>5,1</b> | <b>-*</b>   |
| <b>KOLFUGÓ 25 FW</b>                            | <b>3,4</b>                | <b>2,1</b> | <b>-*</b>   |
| <b>NIMRÓD 25 EC</b>                             | <b>1,6</b>                | <b>3,8</b> | <b>4,6</b>  |
| <b>PUNCH 40 EC</b>                              | <b>3,1</b>                | <b>4,0</b> | <b>11,2</b> |
| <b>KASUMIN 2L</b>                               | <b>0,9</b>                | <b>3,8</b> | <b>4,6</b>  |
| <b>NAOH 0,1 M+SDS 1%<br/>(pozitív kontroll)</b> | <b>11,5</b>               | <b>-</b>   | <b>-</b>    |

\* A 100%-os töménységhez tartozó irritációs indexek meghatározása nem volt elvégezhető, mert a tömény színes készítmények elfedték a membránt és így akadályozták az elváltozások kiértékelését.

A számítógépes program segítségével kapott irritációs indexeket beillesztve a 2. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A KARATHANE LC fungicid 1%-os emulziója gyengén, 10%-os emulziója közepesen irritatív az irritációs indexek alapján.

A KOLFUGÓ 25 FW fungicid 1 és 10%-os emulziója az irritációs indexek alapján gyengén irritatív.

A NIMRÓD 25 EC fungicid 1, 10 és 100%-os emulziója gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

A PUNCH 40 EC fungicid 1 és 10%-os emulziója az irritációs indexek alapján gyengén, 100%-os emulziója erősen irritatív.

A KASUMIN 2L baktericid 1%-os emulziója nem, 10 és 100%-os emulziója gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

A pozitív kontrollként alkalmazott 0,1 M-os NaOH és 1%-os SDS oldatok erősen irritatívak az irritációs indexek alapján.

#### 5.1.2.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok makroszkópos eredményeinek értékelése

Az adalék- és segédanyagok hatására a tyúktojás chorioallantois membránján kialakult károsodásokhoz a számítógépes program alapján hozzárendelt irritációs indexeket a 6. táblázatban foglaltam össze.

#### 6. táblázat Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok irritációs indexei

| Vizsgálati anyagok                              | Irritációs indexek |     |            |
|-------------------------------------------------|--------------------|-----|------------|
|                                                 | 1%                 | 10% | 100%       |
| <b>XILOL</b>                                    | -                  | -   | <b>9,3</b> |
| <b>TREND</b>                                    | -                  | -   | <b>9,1</b> |
| <b>NAOH 0,1 M+SDS 1%<br/>(pozitív kontroll)</b> | <b>11,5</b>        | -   | -          |

A számítógépes program segítségével kapott irritációs indexeket beillesztve a 2. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A XILOL szerves oldószer 100%-os koncentrációjú oldata az irritációs indexek alapján erősen irritatív.

A TREND anionos nedvesítő tömény készítménye az irritációs indexek alapján erősen irritatív.

A pozitív kontrollként alkalmazott 0,1 M-os NaOH és 1%-os SDS oldatok erősen irritatívak az irritációs indexek alapján.

#### 5.1.2.5. Folyékony műtrágyák makroszkópos eredményeinek értékelése

A folyékony műtrágyák hatására a tyúktojás chorioallantois membránján kialakult károsodásokhoz a számítógépes program alapján hozzárendelt irritációs indexeket a 7. táblázatban foglaltam össze.

**7. táblázat Folyékony műtrágyák irritációs indexei**

| Vizsgálati anyagok                              | Irritációs indexek |            |            |
|-------------------------------------------------|--------------------|------------|------------|
|                                                 | 1%                 | 10%        | 100%       |
| <b>NITROSOL 28</b>                              | -                  | <b>5,9</b> | <b>7,0</b> |
| <b>KALCINOL</b>                                 | -                  | <b>4,6</b> | <b>5,9</b> |
| <b>NAOH 0,1 M+SDS 1%<br/>(pozitív kontroll)</b> | <b>11,5</b>        | -          | -          |

A számítógépes program segítségével kapott irritációs indexeket beillesztve a 2. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A NITROSOL 28 folyékony műtrágya 10 és 100%-os emulziója közepesen irritatív az irritációs indexek alapján.

A KALCINOL folyékony műtrágya 10%-os emulziója az irritációs indexek alapján gyengén, 100%-os emulziója közepesen irritatív.

A pozitív kontrollként alkalmazott 0,1 M-os NaOH és 1%-os SDS oldatok erősen irritatívak az irritációs indexek alapján.

### **5.1.3. Mikroszkópos eredmények**

#### **5.1.3.1. A fénymikroszkópos vizsgálatok eredményei**

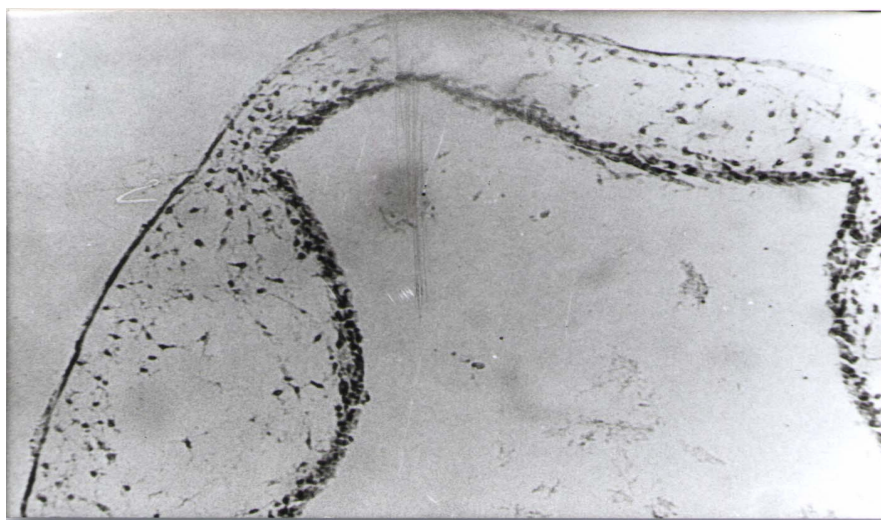
A 7. ábrán egy kezeletlen kontroll 10 napos tyúktojás hematoxin-eozinnal festett CAM-nak az ép mesenchymája látható.

A FUSILADE S herbiciddel kezelt CAM-on először az apróbb erek dezintegrálódtak, és viszonylag rövid időn belül a kezelés helyén vérzés jelent meg. A hematoxin-eozinnal festett szövettani metszeteken a CAM középső rétegében a vérerek fala a szer hatására sérült és helyenként átszakadt, a vérerek körül diffúzan és körülírt területeken a vér sejtjes elemei és vérsavó található (8.ábra).

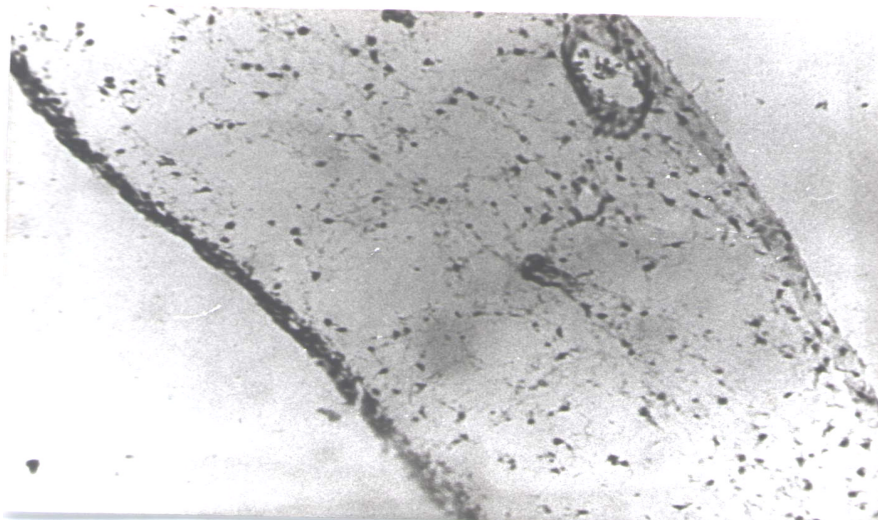
A KARATHANE LC fungiciddel kezelt CAM-on makroszkóposan először véredény lízis, majd vérzés volt megfigyelhető. A hematoxin-eozinnal festett szövettani metszeteken a CAM mesenchymájában található vastag erek sérültek, és helyenként az érfal folytonossági hiánya látható, az erek körül a vér sejtjes elemei figyelhetők meg. A sziktömlő vérerei is átszakadtak, aminek következtében a szikhámsejtek közötti teret a helyenként átszakadt vérerekből kilépő vér sejtjes elemei és a vérsavó tölti ki.

A TREND anionos nedvesítő szer hatására makroszkóposan jól körülírt területen vérzés jelentkezett a CAM-on. A hematoxinilín-eozinnal festett szövettani metszeteken a CAM mesenchymájában található vastag erek sérülése és az érfal átszakadása figyelhető meg, az erek körül diffúzan és körülírt területeken a vér sejtjes elemei és vérsavó található.

A FUSILADE S, KARATHANE LC és a TREND vizsgálati anyagokkal kezelt CAM-ból készült rezorcin-fuksinnal festett metszeteknél az érfal vázát adó elasztikus rostok minden esetben átszakadtak.



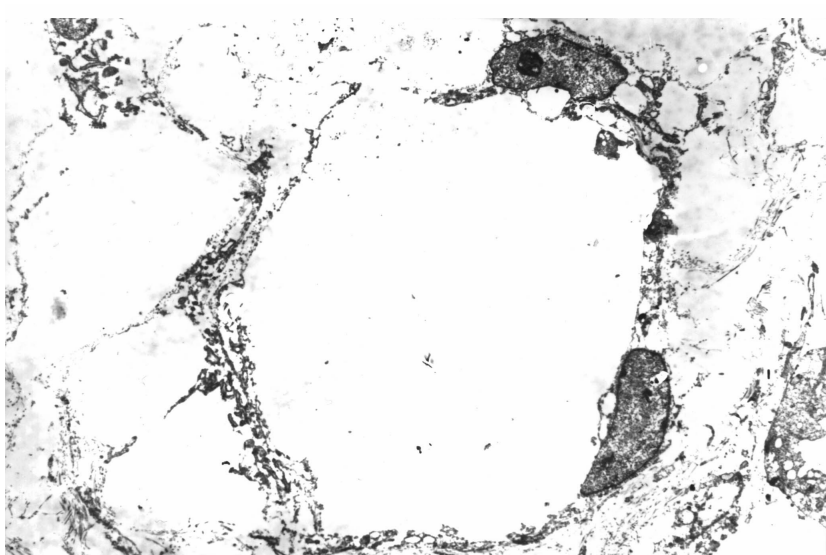
**7.ábra Kezeletlen CAM (H-E festés, 400 x nagyítás)**



**8. ábra 100%-os FUSILADE S-sel kezelt CAM  
(H-E festés, 400 x nagyítás)**

#### **5.1.3.2. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei**

A FUSILADE S, KARATHANE LC és a TREND mezőgazdasági vegyi anyagokkal kezelt CAM szövet darabkákból készült metszetek elektronmikroszkópos vizsgálatai megerősítették a szövettani metszetek fénymikroszkópos értékelése során látottakat, az érfalak elasztikus rostjainak átszakadása következtében vérplazma és eritrociták jelentek meg a CAM mesenchyma állományában a sinusoidok környezetében (9. ábra). Továbbá a kémiai irritáció hatására a CAM mesenchyma állományának felbomlása is látható volt (10. ábra).



**9. ábra 100%-os TREND növényvédő szer segédanyaggal kezelt  
CAM (TEM 5200 x nagyítás)**



**10. ábra 100%-os TREND növényvédő szer segédanyaggal kezelt  
CAM (TEM 10200 x nagyítás)**

## **5.2. A Draize-féle tesztből származó eredmények**

### **5.2.1. Makroszkópos eredmények**

#### **5.2.1.1. Herbicidek makroszkópos eredményei**

A MODOWN 4 F herbiciddel történt kezelés hatására a nyúl szemek szaruhártyáján és a szivárványhártyáján elváltozás nem alakult ki. A kötőhártyán enyhe vérbőség, duzzanat volt megfigyelhető a kezelés eredményeként az 1. órás megfigyelési időpontban, amely tünetek a 2. napi megfigyelési időpontra teljesen megszűntek.

A REGLONE herbiciddel végzett kezelés eredményeként közepes mértékű homály fejlődött ki a kezelt nyúl szemek szaruhártyáján az első napi megfigyelési időpontra, amely tünetek a 7. napi megfigyelési időpontban is jellemzőek voltak. A kezelés hatására a kötőhártyán erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés alakult ki az első órai megfigyelési időpontra. A kötőhártya elváltozások részben enyhültek de a 7. napi értékelési időpontban is megfigyelhetők voltak.

A DIKAMIN D herbiciddel végzett kezelés hatására közepes mértékű szaruhártyahomály fejlődött ki az első napi megfigyelési időpontra, amely a 7. napi megfigyelési időpontra sem gyógyult. A kötőhártyán a kezelés eredményeként erős vérbőség, erős duzzanat és

erős váladékképződés volt megfigyelhető az értékelés 1. órájában, amely elváltozások a 7. napi megfigyelési időpontban is jellemzőek voltak.

A RONSTAR herbiciddel történt kezelés hatására enyhe homály alakult ki a kezelt nyúl szemek szaruhártyáján az első napi megfigyelési időpontra, ami a kezelést követő 4. napi értékelési időpontig volt megfigyelhető. A kötőhártyán a kezelést követő első órai értékelés alkalmával közepes mértékű vérbőség, duzzanat és váladékképződés volt megfigyelhető, amely tünetek fokozatosan enyhültek és a 7. napi megfigyelési időpontra teljesen megszűntek.

A FUSILADE S herbiciddel végzett kezelés eredményeként a szaruhártyán közepes mértékű homály fejlődött ki az 1. napi megfigyelési időpontra, amely tünetek részben enyhülve a 7. napi értékelési időpontban is láthatóak voltak a szaruhártyán. A kezelés hatására a szivárványhártyán gyulladás volt folyamatosan megfigyelhető az utolsó megfigyelési időpontig. A kezelést követő első órai megfigyelési időpontban erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés jelentkezett, amely tünetek enyhébb formában a 7. napi megfigyelési időpontban is jellemzőek voltak.

A FLUBALEX herbiciddel történt kezelést követően erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés volt megfigyelhető a nyúl szemek kötőhártyáján. A kötőhártyán tapasztalt tünetek fokozatosan gyógyultak és a 7. napi megfigyelési időpontra teljesen megszűntek. A kezelés hatására a szaruhártyán enyhe homály jelentkezett az 1. napi értékelési

időpontban, a kezelést követő 2. napra azonban a szaruhártya tünetmentessé vált.

A REFINE DF herbiciddel elvégzett kezelés hatására a szaruhártyán és a szivárványhártyán tünetek nem fordultak elő. A kötőhártyán a kezelést követő egy órával erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés jelentkezett. A kötőhártya-elváltozások folyamatosan enyhültek, és a kezelt nyúlszemek a 7. napi megfigyelési időpontra tünetmentessé váltak.

A TITUS 25 DF herbiciddel történt kezelés eredményeként a szaruhártyán és a szivárványhártyán elváltozások nem jelentkeztek. A kötőhártyán erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés volt megfigyelhető a kezelést követő 1. órás megfigyelési időpontban. A kötőhártyán tapasztalt tünetek fokozatosan gyógyultak és a 7. napi megfigyelési időpontra teljesen megszűntek.

Az ARELON 500 FW herbiciddel elvégzett kezelést követően a megfigyelési időpontokban a szaruhártyán és a szivárványhártyán elváltozást nem tapasztaltam. A kötőhártyán enyhe vérbőség, enyhe duzzanat és enyhe váladékképződés volt megfigyelhető az ARELON 500 FW hatására a kezelést követő első órában. A kezelést követő 2. napi megfigyelési időpontban a kezelt nyúlszemek kötőhártyái elváltozást nem mutattak, normális állapotúvá váltak.

A BANVEL 480 S herbiciddel történt kezelést követően egy nyúl esetében közepes erősségű homály, míg két nyúl esetében enyhe mértékű

homály fejlődött ki a szaruhártyán. A kifejlődött szaruhártyahomályok a megfigyelési idő teljes időtartama alatt jelentkeztek. A kezelés eredményeként gyulladás alakult ki a szivárványhártyán, ami még a vizsgálat végén, a legutolsó megfigyelési időpontban is megfigyelhető volt. A kötőhártyán a kezelés hatására erős vérbőség, erős duzzanat és erős váladékképződés jelentkezett. A kötőhártya elváltozások a 7. napi megfigyelési időpontra enyhe mértékűvé váltak.

A MEDALLON herbiciddel elvégzett kezelés eredményeként erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés volt megfigyelhető a nyúl szemek kötőhártyáján, amely tünetek fokozatosan gyógyultak és a 7. napi megfigyelési időpontra megszűntek. A kezelés hatására a szaruhártyán enyhe homály volt megfigyelhető az 1. napi értékelési időpontban, a kezelést követő 2. napra azonban a szaruhártya tünetmentessé vált.

A TELL 75 WG herbiciddel elvégzett kezelés hatására a szaruhártyán enyhe mértékű homály fejlődött ki az első napi megfigyelési időpontra két nyúl esetében. A szaruhártya homály a 2. napi megfigyelési időpontra megszűnt. A kezelés eredményeként a kötőhártyán közepes vérbőség, duzzanat és váladékképződés volt megfigyelhető az értékelés első órájában. A kötőhártya-elváltozásokat mutató nyúl szemek a 4. napi megfigyelési időpontra meggyógyultak.

#### **5.2.1.2. Inszekticidek makroszkópos eredményei**

A SUMITHION 50 EC inszekticiddel történt kezelés eredményeként a nyúl szem kötőhártyáján erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés alakult ki az első órai megfigyelési időpontra, amelyek részben enyhültek a 7. napi értékelési időpontra. Az inszekticiddel végzett kezelés hatására a szaruhártyán közepes mértékű homály alakult ki a megfigyelési idő 1. napjára. A szaruhártya-elváltozások az utolsó értékelési időpontban is jelen voltak.

A SHERPA inszekticiddel végzett kezelés hatására a nyúl szem kötőhártyáján erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés jelentkezett a kezelést követő egy órás megfigyelési időpontban. A kötőhártyán tapasztalt tünetek részben enyhültek a 7. napi megfigyelési időpontra. A nyúl szem szaruhártyáján közepes mértékű homály fejlődött ki a kezelést követő első napon, amely tünet a 7. napi megfigyelési időpontban is jellemző volt.

#### **5.2.1.3. Fungicidek, baktericidek makroszkópos eredményei**

A KARATHANE LC fungiciddel elvégzett kezelést követően közepes mértékű homály jelentkezett a nyulak kezelt szemeinek szaruhártyáján az első napi megfigyelési időpontban. A homály az utolsó, 7. napi megfigyelés alkalmával még jelen volt a szaruhártyán. A kezelés eredményeként a kötőhártyán erős vérbőség, erős duzzanat és erős

váladékképződés jelentkezett a megfigyelési idő első napján, amely tünetek az utolsó megfigyelési időpontra kismértékű javulást mutattak.

A KOLFUGO 25 FW fungiciddal történt kezelés eredményeként a nyúlszem szaruhártyáján és szivárványhártyáján elváltozások nem jelentkeztek. A kötőhártyán enyhe vérbőség, duzzanat és váladékképződés volt megfigyelhető a kezelést követő 1. órás megfigyelési időpontban. A kötőhártyán tapasztalt tünetek a 3. napi megfigyelési időpontra teljesen megszűntek.

A NIMRÓD 25 EC fungiciddal végzett kezelés eredményeként a kötőhártyán erős mértékű vérbőség, duzzanat és váladékképződés jelentkezett az 1. órás megfigyelési időpontban, a kötőhártya tünetek folyamatosan mérséklődtek és enyhe formában a 7. értékelési napon is jellemzőek voltak. A kezelés hatására a szaruhártyán enyhe mértékű homály alakult ki a 2. napi megfigyelési időpontra, amely tünetek a 7. értékelési napra teljesen megszűntek.

A PUNCH 40 EC fungiciddal elvégzett kezelés hatására a nyúlszem kötőhártyáján erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés alakult ki a megfigyelési idő 1. órájára, amely tünetek a 7. értékelési napra részben enyhültek. A nyúlszem szaruhártyáján a kezelést követő első napon közepes mértékű homály jelent meg, amely tünet folyamatosan jelen volt a vizsgálat utolsó értékelő időpontjáig.

A KASUMIN 2L baktericiddel történt kezelést követően a nyúl szem kötőhártyáján közepes mértékű vérbőség, duzzanat és váladékképződés alakult ki az 1. órás megfigyelési időpontban, amely tünetek a kezelést követő 4. napra enyhültek és a 7. értékelési napra teljesen megszűntek. A baktericid készítménnyel elvégzett kezelés eredményeként egy nyúl esetében enyhe mértékű szaruhártyahomály alakult ki a 4. napi megfigyelési időpontra, ami az utolsó 7. napi értékelési időpontban is jelen volt.

#### **5.2.1.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok makroszkópos eredményei**

A XILOL szerves oldószer és a TREND anionos nedvesítő szer az irodalmi adatok alapján erősen irritatívak a szemre. A kísérleti állatokat kímélve nem végeztem el a Draize-féle *in vivo* primer szemirritációs vizsgálatot ezen készítményekkel. Az *in vivo* és az *in vitro* tesztek eredményeinek összehasonlításánál a Biztonsági Adatlapokban (TREND Biztonsági Adatlap) és az irodalomban (Kertai P., 1982) szereplő irritációs potenciálokat használtam fel.

#### **5.2.1.5. Folyékony műtrágyák makroszkópos eredményei**

A NITROSOL 28 műtrágyával elvégzett kezelés hatására a szaruhártyán és a szivárványhártyán tünetek nem fordultak elő. A kötőhártyán a kezelés eredményeként az első órai megfigyelési időpontban erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés jelentkezett. A

kötőhártya-elváltozások folyamatosan enyhültek, és a kezelt nyúlszemek a 7. napi megfigyelési időpontra tünetmentessé váltak.

A KALCINOL műtrágyával történt kezelés eredményeként a szaruhártyán és a szivárványhártyán elváltozások nem voltak megfigyelhetők. A kötőhártyán erős vérbőség, duzzanat és váladékképződés jelentkezett a kezelést követő 1. órási megfigyelési időpontban. A kötőhártyán tapasztalt tünetek fokozatosan gyógyultak és a 7. napi megfigyelési időpontra teljesen megszűntek.

#### **5.2.2. A makroszkópos eredmények értékelése**

A makroszkópos eredmények értékelését a Vizsgálati módszer fejezetben (3.3.2.3.1.) leírt 1. táblázat segítségével végeztem el. A vizsgálati anyagokkal történt kezeléseket követően a megfigyelési időpontokban a szem különböző hártyáin jelentkező elváltozásokhoz pontokat rendeltem, majd ezeket összesítve irritációs indexeket képeztem. A vizsgálati anyagok különböző koncentrációjú kezeléseinek hatásaihoz számított irritációs indexeket beillesztve a kiértékelő táblázatba (8. táblázat) meghatároztam az illető vegyi anyag irritációs potenciálját.

**8. táblázat A Draize-féle kiértékelő pontrendszer**

| <b>Irritációs index</b> | <b>Irritációs potenciál</b>             |
|-------------------------|-----------------------------------------|
| <b>0-19</b>             | <b>nem vagy enyhén irritatív</b>        |
| <b>20-49</b>            | <b>mérsékelten, közepesen irritatív</b> |
| <b>50-79</b>            | <b>erősen irritatív</b>                 |
| <b>80-110</b>           | <b>szuper irritatív</b>                 |

**5.2.2.1. Herbicidek makroszkópos eredményeinek értékelése**

A herbicidek hatására a nyúl szem különböző hártyáin (kötő, szaru és szivárvány) kialakult károsodásokhoz az 1. értékelő táblázat alapján hozzárendelt és összesített irritációs indexeket a 9. táblázatban foglaltam össze.

**9. táblázat A herbicidek irritációs indexei**

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>Irritációs index</b> |
|---------------------------|-------------------------|
| <b>MODOWN 4 F</b>         | <b>4</b>                |
| <b>REGLONE</b>            | <b>56</b>               |
| <b>DIKAMIN D</b>          | <b>55</b>               |
| <b>RONSTAR</b>            | <b>49</b>               |
| <b>FUSILADE S</b>         | <b>56</b>               |
| <b>FLUBALEX</b>           | <b>18</b>               |
| <b>REFINE DF</b>          | <b>7</b>                |

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>Irritációs index</b> |
|---------------------------|-------------------------|
| <b>TITUS 25 DF</b>        | <b>7</b>                |
| <b>ARELON 500 FW</b>      | <b>8</b>                |
| <b>BANVEL 480 S</b>       | <b>65</b>               |
| <b>MEDALLON</b>           | <b>10</b>               |
| <b>TELL 75 WG</b>         | <b>7</b>                |

Az irritációs indexeket beillesztve a 8. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A MODOWN 4 F herbicid tömény készítménye az irritációs indexek alapján nem vagy gyengén irritatív.

A REGLONE gyomirtó szer 100%-os készítménye az irritációs indexek alapján erősen irritatív.

A DIKAMIN D herbicid tömény készítménye erősen irritatív az irritációs indexek alapján.

A RONSTAR herbicid 100%-os készítménye az irritációs indexek alapján közepesen irritatív.

A FUSILADE S gyomirtó szer 100%-os készítménye erősen irritatív az irritációs indexek alapján.

A FLUBALEX herbicid tömény készítménye az irritációs indexek alapján gyengén irritatív.

A REFINE DF 100%-os készítménye nem vagy gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

A TITUS 25 DF herbicid tömény készítménye az irritációs indexek alapján nem vagy gyengén irritatív.

Az ARELON 500 FW herbicid 100%-os készítménye nem vagy gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

A BANVEL 480 S herbicid tömény készítménye az irritációs indexek alapján erősen irritatív.

A MEDALLON gyomirtó szer 100%-os készítménye gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

A TELL 75 WG herbicid tömény készítménye nem vagy gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

#### **5.2.2.2. Inszekticidek makroszkópos eredményeinek értékelése**

Az inszekticidek hatására a nyúl szem különböző hártáin (kötő, szaru és szivárvány) kialakult károsodásokhoz az 1. értékelő táblázat alapján hozzárendelt és összesített irritációs indexeket a 10. táblázatban foglaltam össze.

#### **10. táblázat Az inszekticidek irritációs indexei**

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>Irritációs index</b> |
|---------------------------|-------------------------|
| <b>SUMITHON 50 EC</b>     | <b>37</b>               |
| <b>SHERPA</b>             | <b>34</b>               |

Az irritációs indexeket beillesztve a 8. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A SUMITHION 50 EC inszekticid 100%-os készítménye az irritációs indexek alapján közepesen irritatív.

A SHERPA inszekticid tömény készítménye közepesen irritatív az irritációs indexek alapján.

#### **5.2.2.3. Fungicidek, baktericidek makroszkópos eredményeinek értékelése**

A fungicidek, baktericidek hatására a nyúl szem különböző hártyáin (kötő, szaru és szivárvány) kialakult károsodásokhoz az 1. értékelő táblázat alapján hozzárendelt és összesített irritációs indexeket a 11. táblázatban foglaltam össze.

#### **11. táblázat Fungicidek, baktericidek irritációs indexei**

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>Irritációs index</b> |
|---------------------------|-------------------------|
| <b>KARATHANE LC</b>       | <b>52</b>               |
| <b>KOLFUGO 25 FW</b>      | <b>4</b>                |
| <b>NIMRÓD 25 EC</b>       | <b>19</b>               |
| <b>PUNCH 40 EC</b>        | <b>57</b>               |
| <b>KASUMIN 2 L</b>        | <b>9</b>                |

Az irritációs indexeket beillesztve a 8. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A KARATHANE LC fungicid 100%-os készítménye erősen irritatív az irritációs indexek alapján.

A KOLFUGO 25 FW fungicid tömény készítménye az irritációs indexek alapján nem vagy gyengén irritatív.

A NIMRÓD 25 EC fungicid 100%-os készítménye gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

A PUNCH 40 EC fungicid tömény készítménye az irritációs indexek alapján erősen irritatív.

A KASUMIN 2L baktericid 100%-os készítménye nem vagy gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

#### **5.2.2.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok makroszkópos eredményeinek értékelése**

A XILOL szerves oldószer és a TREND anionos nedvesítő szer a biztonsági adatlapok (TREND Biztonsági Adatlap) és az irodalmi adatok (Kertai P., 1982) alapján erősen irritatívak a szemre.

#### **5.2.2.5. Folyékony műtrágyák makroszkópos eredményeinek értékelése**

A folyékony műtrágyák hatására a nyúl szem különböző hártályain (kötő, szaru és szivárvány) kialakult károsodásokhoz az 1. értékelő táblázat alapján hozzárendelt és összesített irritációs indexeket a 12. táblázatban foglaltam össze.

**12. táblázat Folyékony műtrágyák irritációs indexei**

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>Irritációs index</b> |
|---------------------------|-------------------------|
| <b>NITROSOL 28</b>        | <b>8</b>                |
| <b>KALCINOL</b>           | <b>8</b>                |

Az irritációs indexeket beillesztve a 8. táblázatba a következő irritációs potenciálokat kaptam.

A NITROSOL 28 folyékony műtrágya tömény készítménye az irritációs indexek alapján nem vagy gyengén irritatív.

A KALCINOL folyékony műtrágya 100%-os készítménye nem vagy gyengén irritatív az irritációs indexek alapján.

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. A HET-CAM teszt és a Draize-féle teszt eredményeinek összehasonlítása

#### 6.1.1. A herbicidek eredményeinek összehasonlítása

Az *in vitro* HET-CAM teszt és az *in vivo* Draize-féle tesztből származó 100%-os koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálok herbicidenkénti összehasonlítását a 13. táblázat tartalmazza.

13. táblázat A herbicidek irritációs potenciáljainak összehasonlítása

| Vizsgálati anyagok | HET-CAM tesztből származó irritációs potenciálok | Draize-féle tesztből származó irritációs potenciálok |
|--------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| MODOWN 4 F*        | gyengén irritatív                                | gyengén irritatív                                    |
| REGLONE*           | közepesen irritatív                              | erősen irritatív                                     |
| DIKAMIN D          | erősen irritatív                                 | erősen irritatív                                     |
| RONSTAR            | közepesen irritatív                              | közepesen irritatív                                  |
| FUSILADE S         | erősen irritatív                                 | erősen irritatív                                     |
| FLUBALEX           | gyengén irritatív                                | gyengén irritatív                                    |
| REFINE DF*         | gyengén irritatív                                | gyengén irritatív                                    |
| TITUS 25 DF*       | gyengén irritatív                                | gyengén irritatív                                    |
| ARELON 500 FW      | közepesen irritatív                              | gyengén irritatív                                    |

| Vizsgálati anyagok | HET-CAM tesztből származó irritációs potenciálok | Draize-féle tesztből származó irritációs potenciálok |
|--------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| BANVEL 480 S       | erősen irritatív                                 | erősen irritatív                                     |
| MEDALLON           | gyengén irritatív                                | gyengén irritatív                                    |
| TELL 75 WG         | nem irritatív                                    | gyengén irritatív                                    |

\* A HET-CAM teszt esetében a 10%-os koncentrációval kapott eredmények irritációs potenciáljai.

A MODOWN 4 F, REGLONE, REFINE DF és a TITUS 25 DF herbicidek HET-CAM tesztel történő vizsgálatuk során a készítmények fizikai és kémiai tulajdonságai akadályozták az elváltozások kiértékelését. Ezen készítmények esetében a 10%-os koncentrációhoz tartozó irritációs indexeket nem lehet egyértelműen összehasonlítani a Draize-féle tesztből származó 100%-os koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálokkal.

A DIKAMIN D herbicid erősen irritatívnak bizonyult az *in vitro* és az *in vivo* tesztek értékelése alapján. A RONSTAR herbicid közepesen irritatív mindkét értékelő pontrendszer alapján. A FUSILADE S erősen irritatív mind a HET-CAM, mind a Draize-féle teszt alapján. A FLUBALEX herbicid gyengén irritatív mind az *in vitro*, mind az *in vivo* teszt kiértékelése szerint. Az ARELON 500 FW herbicid közepesen irritatív az *in vitro* teszt alapján, az *in vivo* teszt értékelése szerint gyengén irritatív. A BANVEL 480 S herbicid mindkét értékelő pontrendszer alapján erősen irritatív. A MEDALLON herbicid gyengén

irritatívnek bizonyult a HET-CAM és a Draize-féle teszt értékelése alapján. A TELL herbicid nem bizonyult irritatívnek az *in vitro* tesztben, az *in vivo* tesztben azonban gyengén irritatív volt.

A 13. táblázat eredményei alapján a DIKAMIN D, a RONSTAR, a FUSILADE S, a FLUBALEX, a BANVEL 480 S, a MEDALLON herbicidek esetében az *in vitro* HET-CAM teszt és az *in vivo* Draize-féle teszt azonos eredményeket adott. Az ARELON 500 FW és a TELL 75 WG herbicid esetében a kétféle teszt eredményei eltérést mutattak.

Az ARELON 500 FW herbicid esetében a HET-CAM teszt erősebb irritációs potenciált rendelt a készítményhez, mint a Draize-féle teszt. A TELL 75 WG herbicidnél a HET-CAM tesztben a 300 másodperces megfigyelési idő végén jelentkeztek a CAM-on gyenge vérzések, azonban ezen tünetekhez rendelt irritációs indexek alapján nem minősült a készítmény irritatívnek, míg a Draize-féle tesztben ha enyhe formában is, de jelentkeztek kötőhártya-elváltozások, így gyengén irritatívnek minősült.

A MODOWN 4 F, a REGLONE, a REFINE DF és a TITUS 25 DF herbicidek esetében a kétféle tesztből származó eredmények összehasonlításánál nem azonos koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálokat tüntettem fel. Figyelembe véve a kémiai irritáció koncentrációfüggőségét és a HET-CAM teszt során ezen herbicidek 1 és 10%-os koncentrációjú készítményeihez kapott irritációs potenciálok tendenciáját, feltehetően, az *in vitro* módszer is hasonló irritációs kategóriát állapítana meg, mint az *in vivo* módszer, amennyiben a fizikai és kémiai tulajdonságokból eredő korlátok nem jelentkeznének. A MODOW 4 F herbicid tömény készítménye gyengén irritatív az *in vivo*

Draize-féle teszt alapján. Az *in vitro* HET-CAM tesztben az 1 és 10%-os koncentrációhoz tartozó irritációs indexek azonos nagyságrendet képviselnek (2,2; 1,9), a 10-szeres koncentrációbeli különbség nem változtatta meg az irritációs potenciált, és ez a tendencia feltehetően a 100%-os koncentráció esetén sem változna lényegesen, azaz a tömény készítmény is a gyengén irritatív kategóriába kerülne. A REGLONE herbicid esetén, ami a Draize-féle tesztben erősen irritatívnak bizonyult, az 1 és 10%-os koncentrációknál az irritációs indexek növekedésének tendenciája (5,3-6,7) valószínűleg a 100%-os koncentráció esetén is fokozódna, és így közepesen vagy erősen irritatívnak minősülne a készítmény. A REFINE DF és a TITUS 25 DF herbicid a Draize-féle tesztben gyengén irritatívnak bizonyult, a HET-CAM teszt során az 1%-os koncentráció a CAM-on károsodást nem okozott, a 10%-os koncentráció pedig gyengén irritatívnak mutatkozott. Figyelembe véve a koncentráció függvényében jelentkező irritációs indexnövekedést, a 10%-os koncentrációhoz tartozó irritációs index megduplázódása is hasonló eredményt adna az *in vivo* tesztben, azaz gyengén vagy közepesen irritatív lenne a két készítmény.

#### **6.1.2. Az inszekticidek eredményeinek összehasonlítása**

Az *in vitro* HET-CAM teszt és az *in vivo* Draize-féle tesztből származó 100%-os koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálok inszekticidenkénti összehasonlítását a 14. táblázat tartalmazza.

**14. táblázat Az inszekticidek irritációs potenciáljainak összehasonlítása**

| Vizsgálati anyagok | HET-CAM tesztből származó irritációs potenciálok | Draize-féle tesztből származó irritációs potenciálok |
|--------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| SUMITHION 50 EC    | közepesen irritatív                              | közepesen irritatív                                  |
| SHERPA             | közepesen irritatív                              | közepesen irritatív                                  |

A SUMITHION 50 EC inszekticid közepesen irritatívnak bizonyult az *in vitro* és az *in vivo* tesztek értékelése alapján. A SHERPA inszekticid erősen irritatív mind a HET-CAM, mind a Draize-féle teszt alapján.

A 14. táblázat eredményei alapján a SUMITHION 50 EC és a SHERPA inszekticidek esetében az *in vitro* HET-CAM teszt és az *in vivo* Draize-féle teszt azonos eredményeket adott.

**6.1.3. Fungicidek, baktericidek eredményeinek összehasonlítása**

Az *in vitro* HET-CAM teszt és az *in vivo* Draize-féle tesztből származó 100%-os koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálok fungicidenkénti és baktericidenkénti összehasonlítását a 15. táblázat tartalmazza.

**15. táblázat A fungicidek, baktericidek irritációs potenciáljainak összehasonlítása**

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>HET-CAM tesztből származó irritációs potenciálok</b> | <b>Draize-féle tesztből származó irritációs potenciálok</b> |
|---------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>KARATHANE LC*</b>      | <b>közepesen irritatív</b>                              | <b>erősen irritatív</b>                                     |
| <b>KOLFUGO 25 FW*</b>     | <b>gyengén irritatív</b>                                | <b>gyengén irritatív</b>                                    |
| <b>NIMRÓD 25 EC</b>       | <b>gyengén irritatív</b>                                | <b>gyengén irritatív</b>                                    |
| <b>PUNCH 40 EC</b>        | <b>erősen irritatív</b>                                 | <b>erősen irritatív</b>                                     |
| <b>KASUMIN 2L</b>         | <b>gyengén irritatív</b>                                | <b>gyengén irritatív</b>                                    |

\* A HET-CAM teszt esetében a 10%-os koncentrációval kapott eredmények irritációs potenciáljai.

A KARATHANE LC és a KOLFUGO 25 FW fungicidek a HET-CAM tesztrel történő vizsgálatuk során a készítmények fizikai és kémiai tulajdonságai akadályozták az elváltozások kiértékelését. Ezen készítmények esetében a 10%-os koncentrációhoz tartozó irritációs indexeket nem lehet egyértelműen összehasonlítani a Draize-féle tesztből származó 100%-os koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálokkal.

A NIMRÓD 25 EC fungicid gyengén irritatívnak bizonyult az *in vitro* és az *in vivo* tesztek értékelése alapján. A PUNCH 40 EC erősen irritatív mind a HET-CAM, mind a Draize-féle teszt alapján. A KASUMIN 2L baktericid gyengén irritatív mindkét értékelő szempontrendszer alapján.

A 15. táblázat eredményei alapján a NIMRÓD 25 EC, a PUNCH 40 EC és a KASUMIN 2L növényvédő szer esetében az *in vitro* HET-CAM teszt és az *in vivo* Draize-féle teszt azonos eredményeket adott.

A KARATHANE LC és a KOLFUGO 25 FW fungicidek esetében a kétféle tesztből származó eredmények összehasonlításánál nem azonos koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálokat szerepeltettem a 15. táblázatban. Figyelembe véve a kémiai irritáció koncentrációfüggőségét és a HET-CAM teszt során ezen fungicidek 1 és 10%-os koncentrációjú készítményeihez kapott irritációs potenciálok tendenciáját, feltehetően az *in vitro* módszer is hasonló irritációs kategóriát állapítana meg, mint az *in vivo* módszer, amennyiben a fizikai és kémiai tulajdonságokból eredő korlátok nem jelentkeznenek. A KARATHANE LC fungicid 100%-os koncentrációja erősen irritatív az *in vivo* Draize-féle teszt alapján. Az *in vitro* HET-CAM tesztben az 1 és 10%-os koncentrációhoz tartozó irritációs indexek azonos nagyságrendet képviselnek (4,6; 5,1), a 10-szeres koncentrációbeli különbség alig változtatta meg az irritációs potenciált, és ez a tendencia feltehetően a 100%-os koncentráció esetén sem változna lényegesen, a tömény készítmény hasonló eredményt adna az *in vitro* tesztben, azaz közepesen vagy erősen irritatív kategóriába kerülne. A KOLFUGO 25 FW fungicid a Draize-féle tesztben gyengén irritatívnak bizonyult, a HET-CAM teszt során az 1%-os és a 10%-os koncentrációk gyengén irritatívnak minősültek, hasonló nagyságrendű irritációs indexeik alapján. Figyelembe véve a koncentráció függvényében jelentkező irritációs indexcsökkenést, a 100%-os koncentrációhoz tartozó irritációs index is

hasznló kategóriába tartozna az *in vitro* teszt alapján, azaz gyengén irritatív lenne a készítmény.

#### **6.1.4. Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok eredményeinek összehasonlítása**

Az *in vitro* HET-CAM teszt és az irodalomban található *in vivo* Draize-féle tesztből származó 100%-os koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálok készítményenkénti összehasonlítását a 16. táblázat tartalmazza.

#### **16. táblázat Növényvédő szer adalékanyagok, segédanyagok irritációs potenciáljainak összehasonlítása**

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>HET-CAM tesztből<br/>származó irritációs<br/>potenciálok</b> | <b>Draize-féle tesztből<br/>származó irritációs<br/>potenciálok</b> |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>XIOL*</b>              | <b>erősen irritatív</b>                                         | <b>erősen irritatív</b>                                             |
| <b>TREND*</b>             | <b>erősen irritatív</b>                                         | <b>erősen irritatív</b>                                             |

\* Az *in vivo* eredmények a biztonsági adatlapokból (TREND Biztonsági Adatlap) és irodalomból (Kertai P., 1982) származó adatok.

A XIOL szerves oldószer erősen irritatívnak bizonyult az *in vitro* teszt értékelése alapján, az *in vivo* irodalmi adatok alapján szintén erősen irritatív. A TREND anionos nedvesítő szer erősen irritatív mind a HET-CAM teszt alapján, mind az irodalmi Draize-féle tesztek alapján.

A 16. táblázat eredményei alapján a XILOL és a TREND növényvédő szer adalék- és segédanyag az *in vitro* HET-CAM tesztben és az *in vivo* Draize-féle tesztben azonos eredményeket adott.

#### 6.1.5. Folyékony műtrágyák eredményeinek összehasonlítása

Az *in vitro* HET-CAM teszt és az *in vivo* Draize-féle tesztből származó 100%-os koncentrációkhoz tartozó irritációs potenciálok folyékony műtrágyánkénti összehasonlítását a 17. táblázat tartalmazza.

**17. táblázat Folyékony műtrágyák irritációs potenciáljainak összehasonlítása**

| Vizsgálati anyagok | HET-CAM tesztből<br>származó irritációs<br>potenciálok | Draize-féle tesztből<br>származó irritációs<br>potenciálok |
|--------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| NITROSOL 28        | közepesen irritatív                                    | gyengén irritatív                                          |
| KALCINOL           | közepesen irritatív                                    | gyengén irritatív                                          |

A NITROSOL 28 folyékony műtrágya közepesen irritatív az *in vitro* értékelés szerint, az *in vivo* pontrendszer alapján pedig gyengén irritatív. A KALCINOL folyékony műtrágya az *in vitro* HET-CAM teszt alapján közepesen irritatív, míg az *in vivo* Draize-féle teszt alapján gyengén irritatív. A két vizsgált folyékony műtrágya esetén az *in vitro* HET-CAM teszt erősebben értékelte a kémiai irritációt, szigorúbb irritációs kategóriákba sorolta a vizsgálati anyagokat.

## 6.2. A HET-CAM teszt és a Draize-féle teszt eredményeinek statisztikai vizsgálata

Az *in vitro* HET-CAM tesztből és a Draize-féle *in vivo* tesztből származó eredmények statisztikai összehasonlításánál elvégzett Pearson-féle korrelációs vizsgálat jó korrelációt mutatott ki az *in vitro* és az *in vivo* eredmények között ( $r = 0,78447$ ). A kapott korrelációs együttható 1%-os szinten szignifikáns a Student-féle t próba alapján.

Az *in vitro* és *in vivo* tesztekéből származó adatokkal elvégzett regresszió analízis eredményeként a lineáris regressziós egyenlet:

$$y = -5,41 + 5,58x, R^2 = 0,6154.$$

A  $b_0$  paraméter szakmailag nem értelmezhető, a  $b_1$  paraméter értéke 5,58. Az *in vitro* HET-CAM tesztből származó irritációs index egy egységgel történő változására a Draize-féle *in vivo* tesztből származó irritációs index 5,58 egységnyi növekedése várható átlagosan.

## 6.3. A mikroszkópos eredmények értékelése

A szövettani vizsgálatok során alkalmazott növényvédő szerek és a növényvédő szer adalékanyag hatására a CAM-on makroszkóposan lízis és jól körülírt területen vérzés jelentkezett. A hematoxin-eozinnal festett szövettani metszeteken az érfal folytonossági hiánya volt látható és a vérereken kívül a középső rétegben a vér alakos elemei tűntek elő. A rezorcín-fuxinnal festett metszeteken látható volt, hogy az érfalak vázát adó elasztikus rostok a kémiai irritáció hatására átszakadtak, ami érfal

folytonossági hiányokat eredményezett, és a vérplazma, valamint az eritrociták a környező szövetekbe kerültek.

A kémiai irritáció hatására az *in vitro* HET-CAM teszt makroszkópos értékelés során, a CAM vérrendszerében kialakult elváltozások szövettani vizsgálatával tovább javítható a vizsgálati módszer érzékenysége, és a CAM-on jelentkező károsodások kiértékelésében a szubjektivitás is csökkenthető.

#### **6.4. Következtetések és javaslatok**

A HET-CAM teszt, mint *in vitro* vizsgálati módszer megfelel azoknak a követelményeknek, amelyeket az *in vitro* kísérleti módszerekkel szemben általában támasztanak. Olcsóbb és gyorsabb, mint a hagyományos Draize-féle *in vivo* vizsgálat, érzékenysége megfelelő, az eredményei jól reprodukálhatóak. Tesztobjektumként tyúktojást használ, ezért az emlős kísérleti állatok felhasználása jelentősen csökkenthető, illetve akár mellőzhető is lenne ezen metodika széles körű elterjedésének eredményeként. Hátrányai közé tartozik az, hogy az eredmények értékelésében még mindig nagy szerepe van a szubjektitásnak, és a kísérleti anyagok fizikai és kémiai tulajdonsága befolyásolhatja az eredmények kiértékelését.

A vizsgálataim során alkalmazott mezőgazdasági vegyi anyagok esetében az *in vitro* HET-CAM tesztből kapott eredmények és a Draize-féle *in vivo* eredmények összehasonlításából az a következtetés vonható le, hogy az *in vitro* HET-CAM teszt jól használható a mezőgazdasági vegyi anyagok, elsősorban növényvédő szerek irritatív potenciáljának

meghatározására. Az összehasonlító vizsgálatok esetében az *in vitro* eredmények jó korrelációt ( $r = 0,78449$ ) mutatnak az *in vivo* adatokkal. Azon mezőgazdasági vegyi anyagok esetében, ahol az *in vivo* eredményekhez képest eltérést mutattak az *in vitro* eredmények, a HET-CAM teszt erősebb irritációt értékelt (kivétel a TELL 75 WG herbicid), amely a kísérleti módszer nagyfokú érzékenységevel magyarázható. Ha figyelembe vesszük, hogy az emberi egészségkockázat meghatározásánál a legrosszabb eset (worst case) feltételezés alkalmazható, akkor a HET-CAM teszt "szigorúbb" értékelése nem biztos, hogy hátrányos.

A HET-CAM teszt alkalmazhatósági korlátai elsősorban azon mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálatokor jelentkeznek, amelyek fizikai, kémiai tulajdonságuknál fogva elfedik a membránt, és így akadályozzák a CAM-on a kezelés hatására kialakuló elváltozások értékelését. Lehetséges megoldásként jelentkezik ezen tömény állapotban átlátszatlan, illetve színes vegyi anyagok vizsgálata során a tízszeres hígítású koncentrációk alkalmazása. Blein és mtsai (1991) jó eredményeket kaptak a 10%-os koncentrációjú vizsgálati anyagok *in vitro* HET-CAM tesztel végzett vizsgálataik során. Az eredeti, Luepke által kidolgozott módszerben (Luepke, 1986) az oldhatatlan anyagokat egy rövid (20 másodperc) expozíciós időt követően kiöblítik a CAM felületéről, és 300 másodperces megfigyelési időt alkalmazva értékeli a CAM-on jelentkező elváltozásokat. Ezt az eljárást többen - függetlenül a vizsgálati anyagok oldhatósági tulajdonságaitól - általánosan alkalmazzák (Van Erp és Weterings, 1990; Lawrence és mtsai, 1990; Kojima és mtsai, 1995). A kiöblítés elvégzése azonban önmagában is membrán károsító, így ezen kezelési eljárás alkalmazása nem biztos,

hogy megbízható eredményeket ad. További hátrányként jelenhet meg a viszonylag nagyfokú szubjektivitás, amely a CAM-on jelentkező elváltozások értékelésénél tapasztalható. A szubjektivitás csökkenthető jól ismert irritációs potenciálú referencia anyagok használatával, és a válaszreakciók értékelését segítő leírójellegű standard reakciókat (makroszkópos és mikroszkópos szinten) bemutató fotóatlaszok alkalmazásával. A CAM szöveti struktúrájában bekövetkező elváltozások mikroszkópos értékelése, a makroszkópos értékelés kiegészítéseként további segítséget jelenthet az irritatív hatások meghatározásában.

A különböző kémiai karakterű vegyi anyagok (ipari és háztartási vegyi anyagok, kozmetikai készítmények, gyógyszerek) *in vitro* HET-CAM teszttel meghatározott irritációs eredményei általában jó korrelációt mutatnak az *in vivo* eredményekkel (Leighton és mtsai, 1985; Luepke és mtsai, 1986, 1987; Van Erp és mtsai, 1990; Blein és mtsai, 1991; Rougier és mtsai, 1992; Bagley és mtsai, 1992, 1994; Spielmann és mtsai, 1993, 1996; Sina és mtsai, 1995; Christian és Diener, 1996). Azonban ez a jó korreláció nem általános, más szerzők (Lawrence és mtsai, 1990; Bruner és mtsai, 1991) vizsgálataiban nagyobb eltérések jelentkeztek az *in vitro* és az *in vivo* eredmények között.

A kísérletbe vont mezőgazdasági vegyi anyagok *in vivo* és *in vitro* eredményeinek összehasonlításából, és a nemzetközi szakirodalomban található hasonló jellegű eredményekből a HET-CAM teszt felhasználhatóságára vonatkozóan a következő vélemény formálható meg. A HET-CAM teszt jelen formájában nem alkalmas az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs vizsgálat teljes egészében történő kiváltására.

Az esetleges emberi szemmérgezés állatkísérleti modellezésére jelenleg az általánosan elfogadott Draize-féle teszt (és fejlesztett változatai) használható fel, ezen *in vivo* tesztet csak olyan *in vitro* módszer válthatná fel teljes egészében, amely legalább olyan jó eredményeket ad, mint az, amelynek kiváltására javasolják.

A HET-CAM teszt jelen formájában, mint szemirritációs elővizsgálati módszer javasolható, így alkalmazásával csökkenthető az emlős kísérleti állat felhasználás. Egyes nemzeti hatóságok, például a német, 1992-től elfogadják a chorioallantois membránt felhasználó *in vitro* módszerek felhasználását az erősen irritatív anyagok (R 41) meghatározására (Balls és mtsai, 1999).

Az *in vivo* Draize-féle teszt kiváltására javasolt *in vitro* módszerekkel - így a tyúktojás chorioallantois membránját felhasználó vizsgálati módszerekkel - elvégezett összehasonlító vizsgálatok eredményei alapján egyetlen *in vitro* metodika sem alkalmas jelenleg az *in vivo* Draize-féle teszt felváltására. Az összehasonlító vizsgálatokat végző tudósok közül egyre többen (Van Erp és mtsai, 1990; Spielman és mtsai, 1996; Mildred és Diener, 1996) helyezkednek arra az álláspontra az *in vivo* Draize-féle teszt kiváltásával kapcsolatban, hogy nem egyetlen *in vitro* metodika, hanem több *in vitro* tesztet kombináló *in vitro* tesztrendszer válthatja majd ki a jövőben az *in vivo* Draize-féle tesztet. Így lehetőség nyílik az *in vitro* metodikák korlátainak kiküszöbölésére.

Az *in vitro* HET-CAM teszt, ha önmagában nem is képes felváltani az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs tesztet, mindenképpen lehetséges eleme lesz azon *in vitro* tesztrendszernek, amely a jövőben képes lesz az *in vivo* vizsgálat kiváltására.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A mezőgazdasági vegyi anyagok a felhasználás során nemcsak a célszervezetekre fejthetik ki biológiai aktivitásukat, hanem közvetlen vagy közvetve kapcsolatba kerülhetnek más élő szervezettel és azok egészségét is károsíthatják. A kijuttatást végző ember testfelszíneire jutva a mezőgazdasági vegyi anyagok egyrészt helyi mérgezést, másrészt az érintkezés helyéről felszívódva általános mérgezést válthatnak ki. A helyi mérgezés során a vegyi anyagok irritatív tulajdonságaitól függően különböző mértékű szem- és bőrkárosodással kell számolnunk.

A mezőgazdasági vegyi anyagok engedélyeztetéséhez szükséges állatkísérleti toxikológiai vizsgálatok közé tartozik az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs teszt, amely alkalmas arra, hogy a nyúl szemébe közvetlenül bejutatott növényvédő szer szemkárosító hatását felmérjük, és az esetleges emberi expozíció esetén a veszélyt előre jelezzük. Az elsősorban állatvédelmi szempontból a sokat kritizált *in vivo* emlős kísérleti állatot felhasználó teszt mellett léteznek olyan kísérleti metodikák, amelyek segítségével csökkenthető a felhasznált kísérleti állatok száma, amelyek finomítva a kísérleti körülményeket a kísérleti állatok szenvedéseinek mérséklését eredményezik, és amelyek alkalmasak lehetnek az emlősállatokon végzett vizsgálatok kiváltására.

A primer szemirritáció területén az OECD 1987-ben beleegyezett abba, hogy a jól érvényesített *in vitro* tesztekéből származó adatokat elfogadják az *in vivo* adatok helyett. A perspektivikus alternatív módszerek jelenleg az engedélyeztetés és az érvényesítés folyamatában

vannak, ezek közé tartoznak a tyúktojás chorioallantois membránját (CAM) használó *in vitro* vizsgálati módszerek.

Kísérleteim során mezőgazdasági vegyi anyagok irritációs potenciálját vizsgáltam az *in vitro* HET-CAM teszttel. A nemzetközi szakirodalmak alapján a tyúktojás chorioallantois membránját használó vizsgálati módszereket ez idáig kozmetikumok, ipari és háztartási vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározására használták fel, agrokemikáliák tesztelésére nem, így az általam elvégzett vizsgálatok a vegyi anyag típusát illetően újak nevezhetők.

Vizsgálataim során célul tűztam ki a különböző mezőgazdasági vegyi anyagok, növényvédő szerek, műtrágyák, növényvédő szer komponensek *in vitro* vizsgálattal történő irritációs potenciáljának meghatározását. A vizsgálati anyagként alkalmazott készítmények kiválasztásánál figyelembe vettem az irodalmi irritációs adatokat, és a nem irritatív vegyületektől az erősen irritatív vegyületekig az irritációs skálának megfelelően vontam be a mezőgazdasági vegyi anyagokat a kísérletekbe.

A kísérleti módszerként alkalmazott *in vitro* HET-CAM teszt esetében a chorioallantois vérérrendszerének vegyi anyag hatására bekövetkezett károsodásait a klasszikus makroszkópos kiértékelés mellett, fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos technikák segítségével is vizsgáltam.

Összehasonlító szándékkal elvégeztem az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs tesztet. Az *in vivo* és az *in vitro* teszt eredményeinek összehasonlításával próbáltam választ adni arra, hogy az *in vitro* HET-CAM teszt jelen formájában felhasználható-e a

mezőgazdasági vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározására és, hogy alkalmas lehet-e az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs teszt felváltására a vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározásában.

Az *in vitro* HET-CAM tesztet az Invitox Protocol 47. száma alapján végeztem el. A tyúktojásokat 10 napig keltettem, majd a méshéj és a héjmembrán eltávolítása után a vizsgálati anyagokat közvetlenül a chorioallantois membránra jutattam rá. A kezelést követően 300 másodpercig figyeltem meg a membránt és a vérrendszerben bekövetkezett károsodásokat és azok megjelenésének időpontját rögzítettem. Az elváltozások kiértékelését számítógépes program segítségével végeztem el, a kapott irritációs indexeket beillesztve egy kiértékelő táblázatba, irritációs potenciálokat határoztam meg.

Az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs vizsgálat elvégzéséhez új-zélandi fehér nyulat használtam. Vizsgálatonként 3 nyulat kezeltem, kontrollként a kezeletlen, ellenoldali szem szolgált (önkontrollos teszt). Az egyik - jobb - oldali szem kötőhártyaszákjába 0,1 ml vagy 0,1 g vizsgálati anyagot helyeztem állatonként. A szemem jelentkező elváltozásokat a kezelést követő 1. óra, 24. óra, 2., 3., 4., 7. nap után értékeltem. A vizsgálati eredmények értékelésének alapjául a Draize-féle szemirritációs módszer pontozási rendszere szolgált. A kapott irritációs indexeket beillesztve a kiértékelő táblázatba meghatároztam az illető vegyi anyag irritációs potenciálját.

A vizsgálatba vont mezőgazdasági vegyi anyagoknak az *in vitro* HET-CAM és az *in vivo* Draize-féle tesztekkel meghatározott irritációs indexeit és irritációs potenciáljait a 18. táblázat tartalmazza.

**18. táblázat A kísérletbe vont mezőgazdasági vegyi anyagok *in vivo* és *in vitro* irritációs indexei és irritációs potenciáljai**

| <b>Vizsgálati anyagok</b> | <b>HET-CAM tesztből származó kategóriák (irritációs indexek)</b> | <b>Draize-féle tesztből származó kategóriák (irritációs indexek)</b> |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>MODOWN 4 F*</b>        | gyengén irritatív (1,9)                                          | gyengén irritatív (4)                                                |
| <b>REGLONE*</b>           | közepesen irritatív (6,7)                                        | erősen irritatív (56)                                                |
| <b>DIKAMIN D</b>          | erősen irritatív (9,1)                                           | erősen irritatív (55)                                                |
| <b>RONSTAR</b>            | közepesen irritatív (5,3)                                        | közepesen irritatív (49)                                             |
| <b>FUSILADE S</b>         | erősen irritatív (9,0)                                           | erősen irritatív (56)                                                |
| <b>FLUBALEX</b>           | gyengén irritatív (4,1)                                          | gyengén irritatív (18)                                               |
| <b>REFINE DF*</b>         | gyengén irritatív (2,2)                                          | gyengén irritatív (7)                                                |
| <b>TITUS 25 DF*</b>       | gyengén irritatív (3,7)                                          | gyengén irritatív (7)                                                |
| <b>ARELON 500 FW</b>      | közepesen irritatív (5,7)                                        | gyengén irritatív (8)                                                |
| <b>BANVEL 480 S</b>       | erősen irritatív (11,1)                                          | erősen irritatív (65)                                                |
| <b>MEDALLON</b>           | gyengén irritatív (2,0)                                          | gyengén irritatív (10)                                               |
| <b>TELL 75 WG</b>         | nem irritatív (0,7)                                              | gyengén irritatív (7)                                                |
| <b>SUMITHION 50 EC</b>    | közepesen irritatív (6,9)                                        | közepesen irritatív (37)                                             |
| <b>SHERPA</b>             | közepesen irritatív (6,9)                                        | közepesen irritatív (34)                                             |
| <b>KARATHANE LC*</b>      | közepesen irritatív (5,1)                                        | erősen irritatív (52)                                                |
| <b>KOLFUGO 25 FW*</b>     | gyengén irritatív (2,1)                                          | gyengén irritatív (4)                                                |
| <b>NIMRÓD 25 EC</b>       | gyengén irritatív (4,6)                                          | gyengén irritatív (19)                                               |
| <b>PUNCH 40 EC</b>        | erősen irritatív (11,2)                                          | erősen irritatív (57)                                                |
| <b>KASUMIN 2L</b>         | gyengén irritatív (4,6)                                          | gyengén irritatív (9)                                                |

| Vizsgálati anyagok | HET-CAM tesztből<br>származó kategóriák<br>(irritációs indexek) | Draize-féle tesztből<br>származó kategóriák<br>(irritációs indexek) |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>XIOL**</b>      | <b>erősen irritatív (9,3)</b>                                   | <b>erősen irritatív (-)</b>                                         |
| <b>TREND**</b>     | <b>erősen irritatív (9,1)</b>                                   | <b>erősen irritatív (-)</b>                                         |
| <b>NITROSOL 28</b> | <b>közepesen irritatív (7,0)</b>                                | <b>gyengén irritatív (8)</b>                                        |
| <b>KALCINOL</b>    | <b>közepesen irritatív (5,9)</b>                                | <b>gyengén irritatív (8)</b>                                        |

\* A HET-CAM teszt esetében a 10%-os koncentrációval kapott eredmények irritációs potenciáljai. A tömény készítmények fizikai, kémiai tulajdonságai akadályozták a kiértékelést

\*\* Az *in vivo* eredmények a biztonsági adatlapokból és irodalomból származó adatok, irritációs indexek nélkül.

A HET-CAM teszt, mint *in vitro* vizsgálati módszer megfelel azoknak a követelményeknek, amelyeket az *in vitro* kísérleti módszerekkel szemben általában támasztanak. Olcsóbb és gyorsabb, mint a hagyományos Draize-féle *in vivo* vizsgálat, érzékenysége megfelelő, az eredményei jól reprodukálhatóak. Tesztobjektumként tyúktojást használ, ezért az emlős kísérleti állatok felhasználása jelentősen csökkenthető, illetve akár mellőzhető is lenne ezen metodika széles körű elterjedésének eredményeként. Hátrányai közé tartozik, hogy az eredmények értékelésében még mindig nagy szerepe van a szubjektivitásnak, és a kísérleti anyagok fizikai és kémiai tulajdonsága befolyásolhatja az eredmények kiértékelését.

A vizsgálataim során alkalmazott mezőgazdasági vegyi anyagok esetében az *in vitro* HET-CAM tesztből kapott eredmények és a Draize-féle *in vivo* eredmények összehasonlításából az a következtetés vonható le, hogy az *in vitro* HET-CAM teszt jól használható a mezőgazdasági vegyi anyagok, elsősorban növényvédő szerek irritatív potenciáljának meghatározására. Az összehasonlító vizsgálatok esetében az *in vitro* eredmények jó korrelációt ( $r = 0,78449$ ) mutatnak az *in vivo* adatokkal.

A HET-CAM teszt alkalmazhatósági korlátai elsősorban azon mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálatakor jelentkeznek, amelyek fizikai és kémiai tulajdonságuknál fogva elfedik a membránt, és így akadályozzák a CAM-on a kezelés hatására kialakuló elváltozások értékelését. Lehetséges megoldásként jelentkezik ezen tömény állapotban átlátszatlan, illetve színes vegyi anyagok vizsgálata során a tízszeres hígítású koncentrációk alkalmazása.

További hátrányként jelenhet meg a viszonylag nagyfokú szubjektivitás, amely a CAM-on jelentkező elváltozások értékelésénél tapasztalható. A szubjektivitás csökkenthető jól ismert irritációs potenciálú referencia anyagok használatával, és a válaszreakciók értékelését segítő leírójellegű standard reakciókat (makroszkópos és mikroszkópos szinten) bemutató fotóatlaszok alkalmazásával. A CAM szöveti struktúrájában bekövetkező elváltozások mikroszkópos értékelése, a makroszkópos értékelés kiegészítéseként további segítséget jelenthet az irritatív hatások meghatározásában.

A különböző kémiai karakterű vegyi anyagok (ipari és háztartási vegyi anyagok, kozmetikai készítmények, gyógyszerek) *in vitro* HET-CAM tesztrel meghatározott irritációs eredményei általában jó korrelációt

mutatnak az *in vivo* eredményekkel. Azonban ez a jó korreláció nem általános.

A kísérletbe vont mezőgazdasági vegyi anyagok *in vivo* és *in vitro* eredményeinek összehasonlításából, és a nemzetközi szakirodalomban található hasonló jellegű eredményekből a HET-CAM teszt felhasználhatóságára vonatkozóan a következő vélemény formálható meg. A HET-CAM teszt jelen formájában nem alkalmas az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs vizsgálat teljes egészében történő kiváltására.

A HET-CAM teszt jelen formájában, mint szemirritációs elővizsgálati módszer javasolható, így alkalmazásával csökkenthető az emlős kísérleti állat felhasználás.

Az *in vitro* HET-CAM teszt fontos eleme lehet azon *in vitro* tesztrendszernek, amely a jövőben képes lesz az *in vivo* Draize-féle primer szemirritációs vizsgálat kiváltására.

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom konzulensemnek, Dr. Várnagy László egyetemi tanárnak áldozatos segítségéért és hasznos tanácsaiért, melyek hozzájárultak doktori disszertációm elkészítéséhez.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Fáncsi Tibor a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Anatómiai és Szövettani Tanszéke egyetemi adjunktusának, és a Kórbonctani Tanszék segítőkész munkatársainak Dr. Drén Csabáné labor asszisztensnek, valamint Szilágyi Péterné elektronmikroszkópos asszisztensnek a szövettani vizsgálatok elvégzésében és értékelésében nyújtott szíves segítségükért.

A Veszprémi Egyetem Georgikon Mezőgazdaság-tudományi Kar Állattudományi Intézet Állattani és Toxikológiai tanszéke, Toxikológia részlege valamennyi munkatársának, külön kiemelve Tóth Ferencné üzemmérnöknek köszönöm, hogy mind a vizsgálatok elvégzésében, mind a dolgozat technikai kivitelezésében segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom a fényképanyag elkészítésében nyújtott segítségéért Dr. Pintér Csabának.

Az eredmények statisztikai feldolgozásához nyújtott segítségét köszönöm Dr. Molnár Tamásnak.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

Almádi, C., Nádasy, M. (1997). Növényvédő szer kémia. PATE GMK (egyetemi jegyzet), Keszthely, 1999. 19, 28, 49, 107, 122, 124, 128.

Bagley, D. M., Bruner, L. H., De Silva, O. (1992). An evaluation of five potential alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*. Toxicol In Vitro. 6. 4. 275-284.

Bagley, D. M., Booman, K.A., Brunner, L.H. (1994a). The SDA Alternatives Program Phase III.: comparison of *in vitro* data with animal eye irritation data on solvents, surfactants, oxidizing agent, and prototype cleaning products. J. Toxicol. Cutan Ocular Toxicol. 13. 2. 127-155.

Bagley, D. M., Waters, D., Kong, B. M. (1994b). Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the draize rabbit eye irritation test. Fd Chem. Toxic. 32. 12. 1155-1160.

Balls, M., Berg, N., Bruner L. H., curren, R. D., De Silva, O., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Fentem, J. H., Liebsch, M., Ohno, Y., Prinsen, M. K., Spielman, H., Worth, A. P. (1999). Eye irritation testing: The way forward. ATLA. 27. 53-77.

Beveridge, W. I. B. és Burnet, F.M. (1946). The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo. Medical Research Council, Special Report Series No. 256, London.

Blein, O., Adolphet, M., Lakhdar, B., Cambar, J., Gubanski, G., Castelli, D., Contie, C., Hubert, F., Latrille, F., Masson, P., Clouzeau, J., Le Bigot, J. F., De Silva, O., Dossou, K. G. (1991). Correlation and validation of alternative methods to the Draize eye irritation test (OPAL Project). Toxic. In Vitro. 5. 5/6. 555-557.

Bogenfürst F. (1995). Keltetés. Gazda Könyvkiadó, Budapest, 1995. 18-27.

Bordás, S. (1971). A növényvédő szer mérgezés elsősegélynyújtása. Mezőgazdasági és Élelmezésügyi Minisztérium. Budapest, 1971. 21.

Bruner, L. H., Denver, J. K., Roberts, D. A., Parker, R. D. (1991). Evaluation of seven *in vitro* alternatives for ocular safety testing. Fund. Appl. Toxicol. 17. 136-149.

Carson, E. R. (1986). The role of mathematical models. ATLA. 13. 4. 295-299.

Christian, M. S. és Diener, R. (1996). Soaps and detergents: Alternatives to animal eye irritation tests. Journal of the American College of toxicology. 15. 1-44.

Dieckert, J.W., Dieckert, M.C., Creger, C.R.(1991). On the existence of a basement membrane at the inner surface of the avian eggshell membrane: implications for differentiation of the chorioallantoic membrane. SAAS Bulletin: Biochem. and Biotech., 4, 34-39.

Dieckert, J.W., Dieckert, M.C., Creger, C.R.(1992). The avian shell membrane pecialized extracellular matrix: implications for differentiation of the chorioallantoic membrane. SAAS Bulletin: Biochem. and Biotech., 5, 30-37.

Draize, J., Woodard, G., Calvery, H. (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.

Fáncsi T., és Fehér Gy. (1978). A chorioallantois-membrán (CAM) szerkezetváltozása a keltetés során, csirkében. Magy. Áo. Lapja. 6. 403-407.

Fehér Gy. (1989). Háziállatok tájanatómiája. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1989. 57-58.

Finney D.J. (1972): An Introduction to Statistical Science in Agriculture. Blackwell Sci. Publ., Oxford, London, Edinburg, Melbourne, 1972.

Fisher, M., és Schoenwolf, G. C. (1983). The use of early chick embryos in experimental embryology and teratology: improvements in standard procedures. *Teratology*. 27. 65.

Gáborjányi R., Kőmives T., Király Z. (1995). A fenntartható mezőgazdaság növényvédelme. *Növényvédelem*, 31. 2. 49-53.

Gilman, M.R. Jackson, E.M. Cerven, D.R. Moreno, M.T. (1983). Relationship between the primary dermal irritation index and ocular irritation. *J. Toxicol. Cutan Ocular Toxicol.* 2. 2,3. 107-117.

Hamilton, H. L. (1952). Lillie's development of the chick. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York, 1952. 272-291.

Havenaar, R., Meijer, J. C., Morton, D. B., Ritskes-Hoitinga, J., Zwart, P. (1993). Biology and husbandary of laboratory animals. In: Van Zutphen, L. F. M., Baumans, V., Beynen, A. C. (eds). *Principles of laboratory animal science*. Elsevier, Amsterdam, 1993. 17-74.

Holdas, S. (1976). Házinyúltenyésztés. In: Horn, A.(szerk.). *Állattenyésztés*. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1976. 343.

Hunyadi, K., Béres, I. (2000). Fontosabb herbicidcsoportok. In: Hunyadi, K., Béres, I., Kazinczi, G. (szerk). *Gyomnövények, gyomirtás, gyombiológia*. Mezőgazda Kiadó. Budapest, 2000. 397-440.

Invitox Protocol Number 47. HET-CAM test 1990.

Karnovsky, M. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use on electronmicroscopy. J. Cell. Biol.. 27. 137.

Kertai, P. (1982). Közegészségtan. Medicina Könyvkiadó. Budapest, 1982. 430.

Kiss, I. (1997). Szervek és szervrendszerek toxikológiája. In: Kiss, I. (szerk.). Toxikológia. Veszprémi Egyetemi Kiadó. Veszprém, 1997. 54-55.

Kojima, H., Hanamura, A., Miyamoto, S., Sato, A., Konishi, H., Yoshimura, I. (1995). Evaluation of seven alternative assays on the main ingredients in cosmetics as predictors of Draize eye irritation scores. Toxic. In Vitro. 9. 3. 333-340.

Kovács Gy., Fehér Gy. (1966). Fejlődéstan. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1966. 140-149.

Krutsay, M. (1980). Szövettani technika. Medicina Könyvkiadó. Budapest, 1980. 61. 71.

Kucsma, Á. (1995). Szerves kémia. ELTE (egyetemi jegyzet). Budapest, 1995.

Lambert, L.A. Chambers, W.A. Green, S. (1993). The use of low-volume dosing in the eye irritation test. Food Chem. Toxicol. 31. 2. 99-103.

Lawrence, R.S. (1987). The chorioallantoic membrane in irritancy testing. In: Atterwill, C.K., Steele, C.E.(eds). In vitro methods in toxicology. Cambridge University Press., Cambridge 1987. 263-278.

Lawrence, R. S., Ackroyd, D. M., Williams, D. L. (1990). The chorioallantoic membrane in the prediction of eye irritation potential. Toxic. In Vitro. 4. 4/5. 321-323.

Leighton, J., Nassauer, J., Tchao, R., Verdone, J., (1983). Development of a procedure using the chick egg as an alternative to the Draize rabbit test. In: Goldberg, A. M. (Ed.). Alternative Methods in Toxicology. 1. Mary Ann Liebert. New York 1983. 163-177.

Leighton, J., Nassauer, J., and Tchao, R. (1985). The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. Fd. Chem. Toxic. 23. 2. 293-298.

Lorenz, K. (1991). " Mentsétek meg a reményt ". Európa Könyvkiadó, Budapest 1991.

Luepke, N. P. (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. Fd. Chem. Toxic. 23. 2. 287-291.

Luepke, N. P., Kemper, F. H. (1986). The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. *Fd. Chem. Toxic.* 24. 495-496.

Luepke, N. P., Wallat, S. (1987). HET-CAM – Reproducibility studies. *Alternative methods in toxicology.* 5. 353-363.

Miklósné Dr. Horváth E. (1991). Tojástermelés a kisgazdaságban. Mezőgazdasági Kiadó KFT. Budapest 1991. 42 .

Nab, J., Balls, M., Hendriksen, C. F. M. (1993). Alternatives to animal experimentation. In: Van Zutphen, L. F. M., Baumans, V., Beynen, A. C. (eds). *Principles of laboratory animal science.* Elsevier, Amsterdam, 1993. 319-333.

Ocskó, Z., Erdős, Gy. (szerk.) (1999). Növényvédő szerek, termésnövelő anyagok II. Agrinex BT. Budapest, 1999. 206. 264.

Ohno, Y., Kaneko, T., Kobayashi, T., Inoue, T., Kuroiwa, Y., Yoshida, T., Momma, J., Hayashi, M., Akiyama, J., Atsumi, T., Chiba, K., Endo, T., Fujji, A., Kakishima, H., Kojima, H., Masamoto, K., Masuda, M., Matsukawa, S., Ohkoshi, K., Okada, J., Sakamoto, K., Takano, K., Takanaka A. (1995). First-phase interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. I. Overview, organization and results of the validation study. *AATEX* 3. 123-136.

Parish, W.E. (1985). Ability of in vitro (corneal injury - eye organ - and chorioallantoic membrane) tests to represent histopathological features of acute eye inflammation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24. 2. 215-227.

Pearson, K. (1901). On lines of points in space and planes of closest fit to systems. *Phil. Mag.* 559-572.

Rougier, A., Cottin, M., De Silva, O. (1992). *In vitro* methods: their relevance and complementary in ocular safety assessment. *Lens Eye Tox. Res.* 9. 3,4. 229-245.

Russel, W. M. S., Burch, R.L. (1959). The principles of humane experimental technique. Methouen, London, 1959.

Shaver Starcross 288 tojóhibrid tartási technológiája, 1978. Kiadja a Bólyi Mezőgazdasági Kombinát.

Seabaugh, V.M. Chambers, W.A. Green, S., Gupta, K. C., Hill, R. N., Hurley, P. M., Lambert, L. A., Lee, C. C., Lee, J. K., Liu, P. T., Lowther, D. K., Roberts, C. D., Springer, J. A., Wilcox, N. L. (1993). Use of ophthalmic topical anesthetics. *Food Chem. Toxicol.* 31. 2. 95-98.

Sina, J. F., Galer, D. M., Sussman, R. G., Gautheron, P. D., Sargent, E. V., Leong, B., Shah, P. V., Curren, R. D., Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fund. Appl. Toxicol.* 26. 20-31.

Speake, B. K., Noble, R. C., McCartney, R. J. (1993). Tissue-specific changes in lipid composition and lipoprotein lipase activity during the development of the chick embryo. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1165, 263-270.

Spielmann, H., Liebsch, M., Gerner, I., Kalweit, S., Wirsberger, T. (1993). Results of the German validation project of alternatives to the Draize eye test (Abstract). In: Goldberg, A. M. (ed). *Alternative methods in toxicology*. 9. Mary Ann Liebert, New York, 1993. 243.

Spielmann, H., Liebsch, M., Kalweit, S., Moldenhauer, F., Wirsberger, T., Holzhütter, H. G., Schneider, B., Glaser, S., Gerner, I., Pape, W.J. W., Kreiling, R., Krauser, K., Miltenburger, H. G., Steiling, W., Luepke, N. P., Müller, N., Kreuzer, H., Murmann, P., Spengler, J., Bertram-Neis, E., Siegemund, B., Wiebel, F. J. (1996). Results of a validation study in Germany on two *in vitro* alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3-NRU cytotoxicity test. *ATLA*, 24. 741-858.

Sváb, J. (1973). *Biometriai módszerek a kutatásban*. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1973. 263-275.

Szentágothai J., Réthelyi M. (1985). *Funkcionális anatómia*. Medicina Könyvkiadó. Budapest, 1985.

Talsma, D.M. Leach, C.L. Hatoum, N.S. Gibbons, R.D. Roger, J.C. Garvin, P.J. (1988). Reducing the number of rabbits in the Draize irritancy test: a statistical analysis of 155 studies conducted over 6 years. *Fund. Appl. Toxicol.* 10. 146-153.

The Agrochemicals Handbook (1991) Third Edition, Royal Society Of Chemistry, Cambridge. England

Tomlin, C. (ed.) (1994): The Pesticide Manual. Crop Protection Publication. The Bath Press, Bath. Tenth Edition.

Trend Biztonságtechnikai adatlap, Du pont de Nemours (France) S. A.

UK Government bans LD<sub>50</sub> test (1999). *ATLA*. 27. 6. 912. Editorial news.

Van Cauteren, H. (1998). The use of laboratory animals in the development of new medicines: past and present benefits and a look to the future. In: O'Donoghue, P. N. (ed). The ethics of animal experimentation. EBRA. London, 1998. 24.

Van Erp, Y. H. M. és Weterings, P. J. J. M. (1990). Eye irritancy screening for classification of chemicals. *Toxic.in Vitro*. 4, 4/5. 267-269.

Verrett, M.J., Scott, W.F., Reynaldo, E.F., Alterman, E.K., Thomas, C.A. (1980). Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. *Toxicol. and App. Pharmacol.* 56. 265.

Walum, E., Balls, M. et al. (1992). ECITTS: An integrated approach to the application of *in vitro* test systems to the hazard assessment of chemicals. ATLA. 20. 416.

Williams, S. J. (1984). Prediction of ocular irritancy potential from dermal irritation test results. *Fd. Chem. Toxic.* 22. 2. 157-161.

Zboray G. (1991). Embriológia. ELTE egyetemi jegyzet. Budapest 1991. 105-108.

Zwilling, E. (1959). A modified chorioallantoic grafting procedure. *Transplantation Bulletin.* 6. 115.

## 10. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként végeztem el mezőgazdasági vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározását az *in vitro* HET-CAM teszttel.

A vizsgálatba vont növényvédő szerek HET-CAM teszttel meghatározott irritatív potenciáljai a következők.

A MODOWN 4 F herbicid 1 és 10%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

A REGLONE herbicid 1 és 10%-os szuszpenziója közepesen irritatív.

A DIKAMIN D herbicid 1 és 10%-os szuszpenziója gyengén, a 100%-os, tömény készítmény erősen irritatív.

A RONSTAR herbicid 1 és 10%-os szuszpenziója gyengén, a 100%-os szuszpenziója közepesen irritatív.

A FUSILADE S herbicid 1%-os szuszpenziója gyengén, 10%-os szuszpenziója közepesen, 100%-os szuszpenziója erősen irritatív.

A FLUBALEX herbicid 1, 10 és 100%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

A REFINE DF herbicid 1%-os szuszpenziója nem, 10%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

A TITUS 25 DF herbicid 1%-os szuszpenziója nem, a 10%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

Az ARELON 500 FW herbicid 1 és 10%-os szuszpenziója gyengén, a 100%-os szuszpenziója közepesen irritatív.

A BANVEL 480 S herbicid 1%-os szuszpenziója gyengén, 10%-os szuszpenziója közepesen, 100%-os szuszpenziója erősen irritatív.

A MEDALLON herbicid 1%-os szuszpenziója nem, 10 és 100%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

A TELL 75 WG herbicid 1, 10 és 100% koncentrációban nem irritatív.

A SUMITHION 50 EC inszekticid 1%-os szuszpenziója gyengén, 10 és 100%-os szuszpenziója közepesen irritatív.

A SHERPA inszekticid 1 és 10%-os szuszpenziója gyengén, 100%-os szuszpenziója közepesen irritatív.

A KARATHANE LC fungicid 1%-os szuszpenziója gyengén, 10%-os szuszpenziója közepesen irritatív.

A KOLFUGO 25 FW fungicid 1 és 10%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

A NIMRÓD 25 EC fungicid 1, 10 és 100%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

A PUNCH 40 EC fungicid 1 és 10%-os szuszpenziója gyengén, 100%-os szuszpenziója erősen irritatív.

A KASUMIN 2L baktericid 1%-os szuszpenziója nem, 10 és 100%-os szuszpenziója gyengén irritatív.

A vizsgálatba vont növényvédő szer segéd- és adalékanyagok HET-CAM teszttel meghatározott irritatív potenciáljai a következők.

A XILOL szerves oldószer 100%-os koncentrációjú oldata erősen irritatív.

A TREND anionos nedvesítő tömény készítménye erősen irritatív.

A vizsgálatba vont folyékony műtrágyák HET-CAM teszttel meghatározott irritatív potenciáljai a következők.

A NITROSOL 28 folyékony műtrágya 10 és 100%-os szuszpenziója közepesen irritatív.

A KALCINOL folyékony műtrágya 10%-os szuszpenziója gyengén, 100%-os szuszpenziója közepesen irritatív.

2. Az *in vitro* HET-CAM tesztből és az *in vivo* Draize-féle tesztből származó eredmények összehasonlító vizsgálatai alapján a HET-CAM teszt alkalmas a növényvédő szerek irritatív potenciáljának meghatározására, figyelembe véve a növényvédő szerek fizikai és kémiai tulajdonságából eredő korlátokat.

3. Az *in vitro* HET-CAM teszt a mezőgazdasági vegyi anyagok engedélyezési célú irritációs tulajdonságainak meghatározásánál nem helyettesítheti az *in vivo* Draize-féle vizsgálati módszert.

4. Az *in vitro* HET-CAM teszt jelen formájában, mint szemirritációs elővizsgálati módszer használható a mezőgazdasági vegyi anyagok irritatív potenciáljának meghatározására.

5. Az *in vitro* HET-CAM teszt fontos eleme lehet azon *in vitro* szemirritációs tesztrendszernek, amely a jövőben képes lehet az *in vivo* Draize-féle teszt kiváltására.